# Analyse der Steroidausscheidung im Harn mittels Glaskapillargaschromatographie —

## Ein Beitrag zur Methodik und Anwendung

Florian Holsboer

1981

Aus der Kinderklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. K. Betke)

# ANALYSE DER STEROIDAUSSCHEIDUNG IM HARN MITTELS GLASKAPILLARGASCHROMATOGRAPHIE - EIN BEITRAG ZUR METHODIK UND ANWENDUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Florian Holsboer

aus München

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. D. Knorr |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. med. K. Betke |
| Dekan: | Prof. Dr. med. W. Spann |

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1981

| Trivialname (+Abkürzung) | Systematische Bezeichnung |
|---|---|
| Androsteron (A) | 3α-Hydroxy-5α -Androstan-17-on |
| Ätiocholanolon (E) | 3α-Hydroxy-5β -Androstan-17-on |
| Dehydroepiandrosteron (DHEA) | 3β-Hydroxy-Androst-5-en-17-on |
| 11ß-Hydroxyandrosteron (11-HA) | 3α-,11ß-Dihydroxy-5α-Androstan-17-on |
| 11ß-Hydroxyätiocholanolon (11 OH-E) | 3α-,11ß-Dihydroxy-5β-Androstan-17-on |
| 11 Ketoandrosteron (11-oxo-A) | 3α-Hydroxy-5α-Androstan-11,17-dion |
| Pregnandiol (Pd) | 3α,2oα-Dihydroxy-5ß-Pregnan |
| 17α-Hydroxypregnanolon (17-OH-P) | 3α,17α-Dihydroxy-5ß-Pregnan-2o-on |
| Pregnantriol (Pt) | 3α,17α,2oα-Trihydroxy-5ß-Pregnan |
| Pregnantriolon (P'triolon) | 3α,17α,2oα-Trihydroxy-5ß-Pregnan-11-on |
| Tetrahydrocortison (THE) | 3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-Pregnan-11,2o-Dion |
| Tetrahydrocortisol (THF) | 3α,11α,17α,21-Tetrahydroxy-5ß-Pregan-2o-on |
| Tetrahydro-11-desoxycortisol (THS) | 3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-Pregnan-2o-on |
| Tetrahydro-11-desoxycorticosteron (TH-DOC) | 3α,21-Dihydroxy-5ß-Pregnan-2o-on |

Trivialnamen, Abkürzungen und systematische Nomenklatur der untersuchten Steroide

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| Einleitung | | 6 |
| I. | AUFBAU DER GLASKAPILLAR-GASCHROMATOGRAPHIE | 8 |
| A. | Aufarbeitung der Harnproben | 8 |
| A.1. | Harnaufbewahrung | 8 |
| A.2. | Enzymatische Spaltung | 8 |
| A.3. | Extraktion freier Harnsteroide | 10 |
| A.3.1. | Extraktion mit organischen Lösungsmitteln | 10 |
| A.3.2. | Extraktion mit Vorreinigung an Adsorberharz | 13 |
| A.3.3. | Extraktion mit Adsorberharz Amberlite XAD-2 und Reinigung durch Ionenaustauscher Amberlyst A-26 | 13 |
| A.3.4. | Kombiniertes Extraktionsverfahren mit Adsorberharz und Nachreinigung durch Ausschütteln mit Waschlösungen | 15 |
| A.4. | Derivatisierung der freien Harnsteroide | 15 |
| A.4.1. | Darstellung der MO-TMS-Äther | 24 |
| A.4.2. | Darstellung der TMS-Enol-TMS-Äther | 24 |

Seite


| | | |
|---|---|---|
| B. | Gaschromatographische Trennung der Harnsteroide | 25 |
| B.1. | Probeneingabe | 25 |
| B.1.1. | Direkteinspritzung | 25 |
| B.1.2. | Einfluß des Septums | 26 |
| B.2. | Versuchsbedingungen bei der GC-Analyse | 31 |
| B.3. | Auswertung der GC-Signale | 32 |
| B.3.1. | Qualitative Auswertung der GC-Signale | 32 |
| B.3.2. | Quantitative Auswertung der GC-Signale | 33 |
| C. | Ergebnisse und Diskussion | 36 |
| C.1. | Vergleich der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden | 36 |
| C.2. | Reaktionskinetische Untersuchungen bei verschiedenen Derivatisierungsmethoden | 43 |
| C.2.1. | Temperaturstabilität des TMS-Enol-TMS-Äthers von THE | 43 |
| C.3. | Einfluß von Katalysatoren auf die Silylierungsreaktion | 48 |
| C.3.1. | TMCS als Katalysator | 48 |
| C.3.2. | Kaliumacetat als Katalysator | 51 |
| C.4. | Qualitative Auswertung der GK-GC-Signale | 53 |
| C.5. | Quantitative Auswertung der GK-GC-Signale | 58 |
| D. | Anhang: Material und Geräte | 64 |

Seite


| | | |
|---|---|---|
| II. | ANWENDUNGSBEISPIELE FÜR DIE GLAS-KAPILLAR-GASCHROMATOGRAPHIE IN DER STEROIDANALYTIK | 69 |
| A. | Literaturüberblick | 69 |
| B.1. | Bestimmung von 17α-Hydroxypregnanolon im Harn von Patienten mit 21-Hydroxylase-mangel | 75 |
| B.2. | Harnsteroidprofil eines Patienten mit 21-Hydroxylasemangel und/oder 11ß-Hydroxylasedefekt | 80 |
| C. | Zusammenfassung | 84 |
| Literaturverzeichnis | | 87 |

## Einleitung

Seit Einführung der Gaschromatographie mit Dünnfilmglaskapillartrennsäulen anstelle der bisher üblichen gepackten Säulen ist es im Rahmen der Steroidanalytik möglich geworden, ohne aufwendige Vorarbeiten die meisten Harnsteroide qualitativ und mit Einschränkungen auch quantitativ zu erfassen. Während die radioimmunologischen Verfahren mit großer Empfindlichkeit lediglich diejenigen Steroide zu erfassen vermögen, deren Existenz bekannt ist und für deren Bestimmung Antikörper vorliegen müssen, kommt der Glaskapillar-Gaschromatographie (GK-GC) in der klinisch-chemischen Analytik eine andere, ergänzende, Rolle zu. Zum einen gelingt es,mit diesem Verfahren auch diejenigen Substanzen zu entdecken, deren Existenz nicht vorherzusehen war und weiter kann durch direkte Kopplung der Glaskapillarsäule an das Massenspektrometer die Struktur der chromatographierten Verbindungen ermittelt werden.

Innerhalb der pädiatrischen Endokrinologie kommt neben der Bestimmung von Peptid- und Steroidhormonen im Plasma der Analyse von Harnsteroiden besondere Bedeutung zu. Die Ausscheidungsraten der individuellen Harnsteroide und deren Relation zueinander ("Steroidprofile") sind sowohl bei diagnostischen Überlegungen wie auch für Verlaufskontrollen von Interesse. In der vorliegenden Arbeit werden im ersten Teil die beim Aufbau und bei der Austestung dieses Analysen-

verfahrens angewandten Arbeitsschritte beschrieben und hinsichtlich ihrer Praktikabilität und Zuverlässigkeitskriterien diskutiert.

Im zweiten Teil soll anhand von Anwendungsbeispielen aus der Literatur und eigenen Untersuchungen die Leistungsfähigkeit der GK-GC-Technik aufgezeigt werden.

# I. AUFBAU DER GLASKAPILLAR-GASCHROMATOGRAPHIE

## A. Aufarbeitung der Harnproben

### A.1. Harnaufbewahrung

Harn wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden (8.00 - 8.00 h) gesammelt, das Volumen gemessen, mit 20 ml Acetat-Pufferlösung (pH = 4,5), zur Vermeidung bakteriellen Abbaus der Steroide wenige Tropfen Chloroform zugesetzt und in Polyäthylenflaschen bei -20° C aufbewahrt. Die Proben lieferten auch noch nach Monaten Ergebnisse, die nicht meßbar von denen abwichen, die bei Analyse unmittelbar nach der Sammelperiode erhalten wurden.

### A.2. Enzymatische Spaltung

Je nach zu erwartender Steroidexkretion wurden der fünfzigste bis zweihundertste Teil der ausgeschiedenen Tagesmenge mit destilliertem Wasser auf 40 ml ergänzt und mit Natriumacetat/Eisessigpuffer auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt.

Da die im Harn ausgeschiedenen Steroide als Sulfat- und Glucuronidkonjugate vorliegen, müssen sie zunächst hydrolysiert werden. Da die Verseifung mit Mineralsäuren oder

Basen bei erhöhter Temperatur zu Zersetzung von α-Diketonen, α-Hydroxyketonen und 18-Hydroxyöstronen führt (CURTIUS und MÜLLER (12)), werden Steroidkonjugate heute nahezu ausschließlich enzymatisch gespalten. Steroidsulfate werden vorzugsweise von mikrosomalen Sulfatasen hydrolysiert, während Glucuronide durch Glucuronidasen, die aus Schnecken gewonnen werden, spaltbar sind. Die hydrolytische Aktivität hängt dabei sowohl von der Struktur des Substrats als auch von der Lokalisation der Konjugation ab. Die Hydrolysenrate nimmt in der Reihenfolge

$$C_3\ (\text{Phenol}) > C_{3\beta} > C_{17\beta} > C_{3\alpha}$$

ab. Wenn alle Steroidkonjugate gespalten werden sollen, eignet sich am besten der Verdauungssaft der Schnecke Helix pomatia. Die darin enthaltenen Hydroxylasen bestehen vorwiegend aus Arylsulfatase und ß-Glucuronidase. Die Sulfatase spaltet Steroidsulfate mit 3ß-OH, 5α- und 3ß-OH,$\Delta^5$ - ungesättigte Steroide sowie Östrogensulfate. Die Affinität zu Steroiden mit 3ß-OH und 5ß-Struktur ist gering. Steroide mit 3α, 5ß-Konfiguration und 5α-Androstan-17-on-3α-Sulfat werden nicht gespalten (LEON et al. (43)).

ß-Glucuronidase spaltet aliphatische und aromatisch konjugierte Steroide, reagiert aber nicht mit α-Glucuroniden. In $C_{17}$- und $C_{20}$-Stellung konjugierte Steroide werden nur in geringer Ausbeute hydrolysiert (SHACKLETON et al. (58)).

Der Verdauungssaft der H.P. enthält noch einige weitere nicht näher identifizierte Enzyme, die auch diejenigen Steroide verseifen, die durch Arylsulfatase und ß-Glucuronidase nicht angegriffen werden.

In der vorliegenden Arbeit galt das Interesse allen vorhandenen Harnsteroiden, weshalb vollständige Hydrolyse angestrebt wurde. Dazu wurde der Analysenansatz mit 200 µl ß-Glucuronidase/Arylsulfatase versetzt und 24 h bei 40° C im Wärmeofen inkubiert.

Bei der unter A.3.2. beschriebenen Extraktionsmethode wurden vor der Inkubation mit Hydroxylasen die Enzyminhibitoren durch Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD-2 abgetrennt, das äthylalkoholische Eluat zur Trockne gebracht, in 40 ml destilliertem Wasser aufgenommen und wie oben beschrieben enzymatisch gespalten.

## A.3. Extraktion freier Harnsteroide

Zur Extraktion der nach enzymatischer Spaltung gewonnenen freien Steroide aus Harn wurden folgende Verfahren angewandt:

### A.3.1. Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Diese Methode lehnt sich eng an ein von PFAFFENBERGER und Mitarb. (51) und HORNING und Mitarb. (31) beschriebenes Verfahren an. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit

und Praktikabilität dieses Verfahrens wurden der Harnprobe vor der Hydrolyse bzw. der wäßrigen Lösung eines Gemisches authentischer Steroide, je 200 µg Androstandiol und Cholesterylbutyrat (als interne Standards IS 1 und IS 2) sowie ca. 1000 cpm [$^3$H]-THF-Lösung und in einem Parallelversuch [$^3$H]-DHEA-Lösung zugegeben.

Die Proben wurden zweimal mit jeweils 100 ml Methylenchlorid und 100 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Die Lösungsmittelauszüge wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, in 15 ml Essigsäureäthylester aufgenommen, dreimal mit einer natriumalkalischen Waschlösung (siehe Material) und dreimal mit einer gesättigten wäßrigen NaCl-Lösung gewaschen. Die Esterphase wurde von Feuchtigkeitsresten durch Zugabe von 1 g getrocknetem Natriumsulfat befreit. Durch Filtration wurde das Salz von der getrockneten Essigesterphase abgetrennt. Die so gereinigte Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 2 ml eingeengt, in ein Spitzglas überführt und auf dem Wärmeblock bei 30° C unter nachgereinigtem Stickstoff zur Trockne gebracht. Der Extrakt wurde nunmehr derivatisiert oder es wurde zur Messung der Wiederfindung von $^3$H-DHEA bzw. $^3$H-THF die $^3$H-Aktivität gemessen.

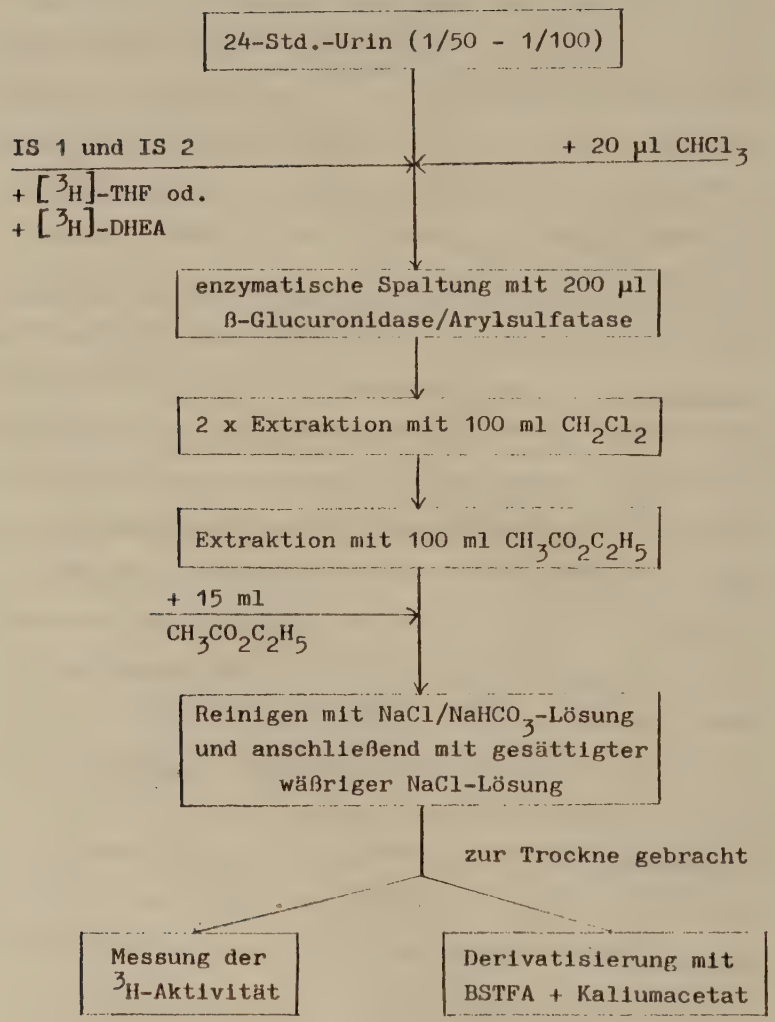



Abb. A.3.1.

Aufarbeitungsschema für Harnsteroide nach der Extraktionsmethode A.3.1.

A.3.2. Extraktion mit Vorreinigung an Adsorberharz

Die Methode basiert auf dem von BRADLOW (4,5) angegebenen Verfahren. Dabei wurde die Urinprobe mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 40 ml verdünnt, bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/min über die mit Amberlite XAD-2 Adsorberharz gefüllte Chromatographiersäule gegeben und mit 30 ml einer 1,2%igen wäßrigen NaCl-Lösung nachgewaschen. Anschließend wurden die lipophilen Adsorbate, darunter auch die Steroidkonjugate, mit 40 ml Äthanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von etwa 30° C abgezogen und wie in A.3.1. angegeben hydrolysiert. Nach der enzymatischen Spaltung wurde entsprechend dem in A.3.4. beschriebenen Vorgehen weitergearbeitet (siehe Abb. A.3.2.).

A.3.3. Extraktion mit Adsorberharz Amberlite XAD-2 und Ionenaustauscher Amberlyst A-26

Dieses Verfahren lehnt sich an die von SHACKLETON (58) angegebene Vorschrift an. Dabei wurde die hydrolysierte Harnprobe nach Zusatz der Standardsteroide (Cholesterylbutyrat und Androstandiol) an einer mit Amberlite XAD-2 gefüllten Säule vorgereinigt. Dabei betrug die Tropfgeschwindigkeit 1 ml/min. Nachgewaschen wurde mit 30 ml einer 1%igen wäßrigen NaCl-Lösung (3 ml/min) und eluiert mit 40 ml Äthanol.

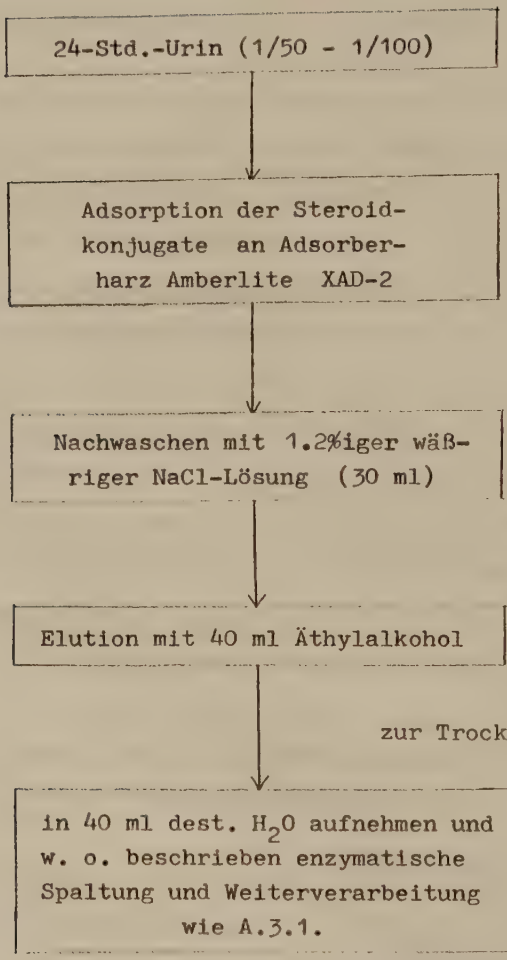



Abb. A.3.2.

Aufarbeitungsschema für Methode A.3.2. mit Vorreinigung durch Adsorption an Amberlite XAD-2.

Das Eluat wurde langsam (1 ml/min) über eine Amberlyst-A-26-Säule gegeben, die mit 10 ml Äthylalkohol nachgewaschen wurde. Der äthylalkoholische Extrakt wurde durch Rotationsverdampfung zur Trockne gebracht und weiterverarbeitet (siehe Abb. A.3.3.).

### A.3.4. Kombiniertes Extraktionsverfahren mit Reinigung an Adsorberharz und Nachreinigung durch Ausschütteln

Die Harnprobe wurde wie in Abschnitt A.3.2. beschrieben enzymatisch mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase gespalten. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Amberlite XAD-2-Säule gegeben, mit 10 ml einer 1.2 %igen NaCl-Lösung nachgewaschen und mit 40 ml Äthanol eluiert. Das Eluat wurde durch Rotationsverdampfung getrocknet, in 15 ml Essigsäureäthylester aufgenommen und wie in A.3.1. beschrieben mit NaCl/$NaHCO_3$- bzw. gesättigter NaCl-Lösung durch Ausschütteln gereinigt und über $Na_2SO_4$ getrocknet. Nach Abtrennung des Lösungsmittels wurde der trockene Harnextrakt derivatisiert (siehe Abb. A.3.4.).

## A.4. Derivatisierung der freien Harnsteroide

Die freien Steroide sind nicht ausreichend flüchtig, um unzersetzt gaschromatographisch getrennt werden zu können. Im einzelnen kommt es infolge der thermischen Labilität der

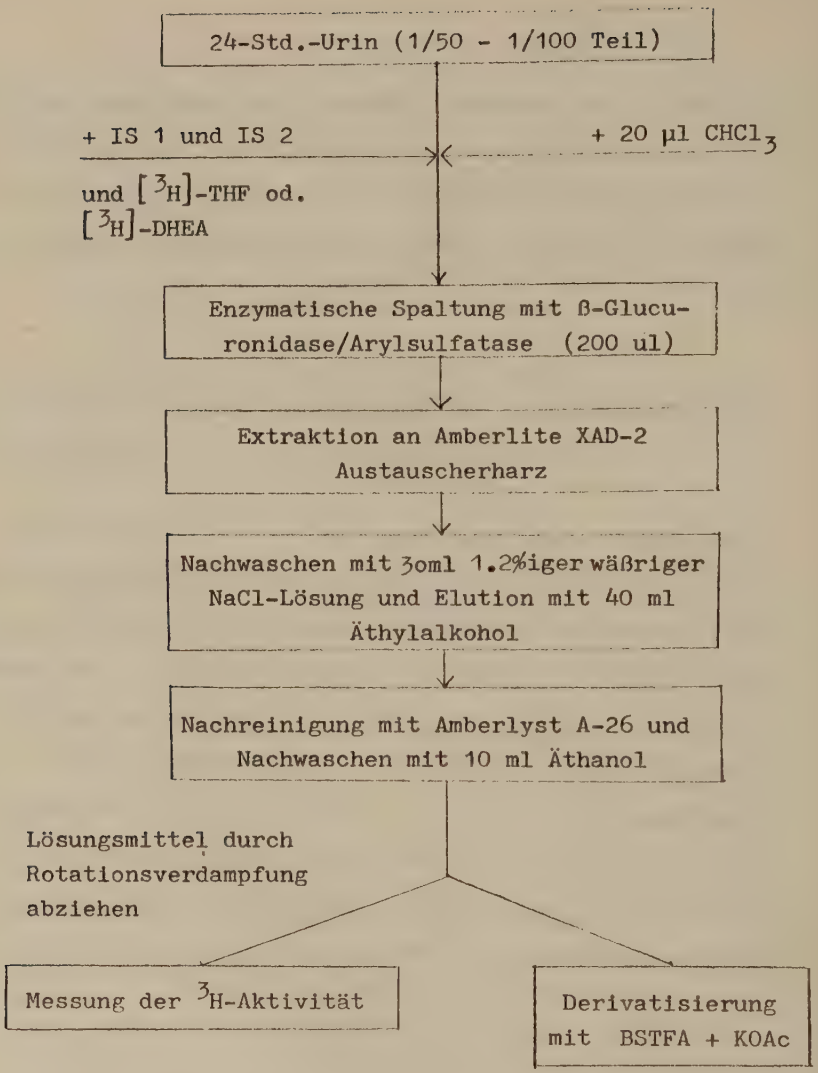



Abb. A.3.3.

Aufarbeitungsschema mit Austauscherharz Amberlite XAD-2 und anschließender Reinigung von Säureresten an Ionenaustauscherharz Amberlyst-A-26 (siehe A.3.3.)

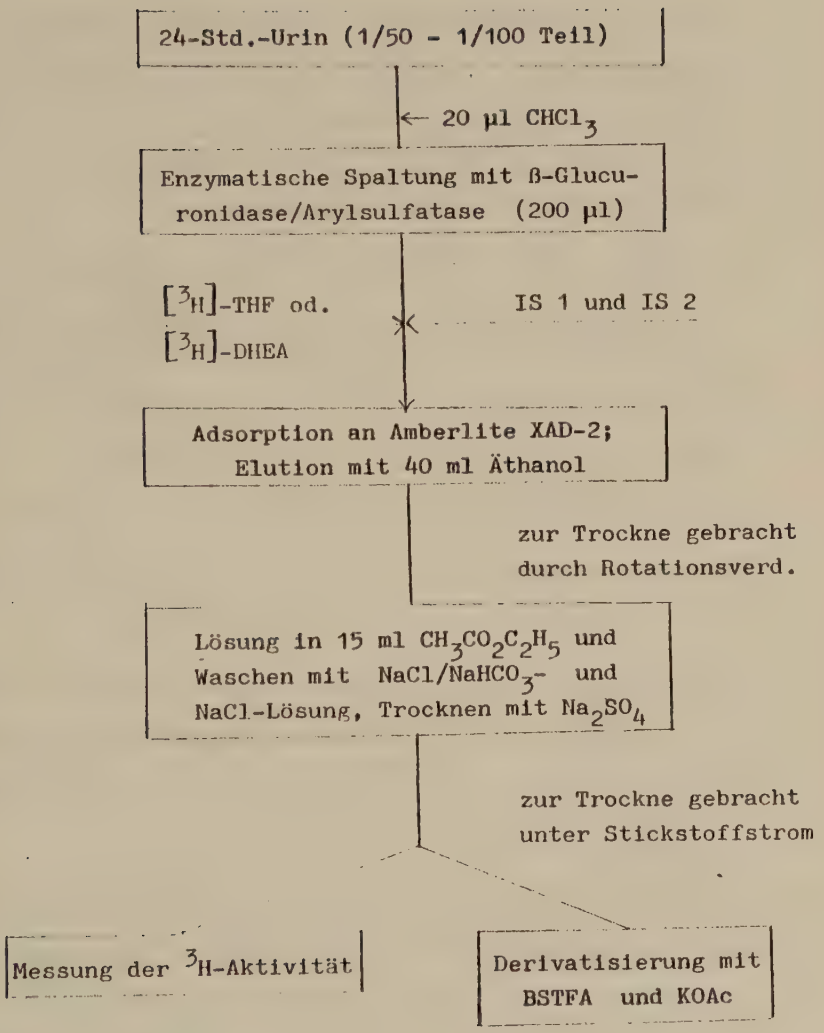



Abb. A.3.4.

Aufarbeitung der Harnprobe mit Reinigung an Amberlite XAD-2-Adsorberharz und Nachreinigung des Eluats durch Ausschütteln mit Waschlösungen

Steroide zur Abspaltung der Dihydroxyacetonseitenkette und Hydroxylgruppen. Weiter kann die Umlagerung von 17-Hydroxy-20-Ketosteroiden zu D-Homosteroiden führen (EIK-NES und HORNING (15)). Es ist daher nötig, die Steroide in Verbindungen zu überführen, die folgende Kriterien erfüllen:

1) Die Derivatisierungsprodukte müssen so flüchtig sein, daß bei der Verdampfung im Einlaßteil des Gaschromatographen keine Zersetzungsprodukte des Steroidderivats selbst oder der anderen in den Harnextrakten enthaltenen Substanzen entstehen, die zur Verletzung der stationären Phase oder Artefaktbildung führen können.

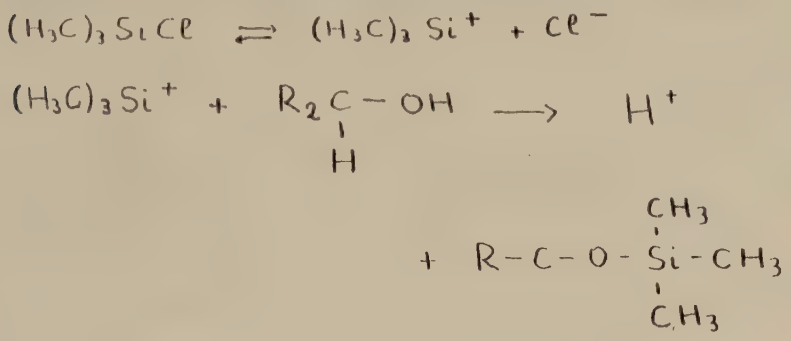
2) Aus jedem in den Harnextrakten enthaltenen Steroid darf nur ein einziges Derivatisierungsprodukt entstehen.

3) Die Derivatisierungsprodukte müssen zumindest so feuchtigkeitsstabil sein, daß beim Überführen des Steroidderivates vom Reaktionsgefäß in den Gaschromatographen keine Zersetzungsprodukte auftreten.

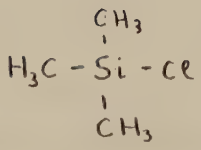
Die meisten der obengenannten Forderungen werden von Trimethylsilyläthern (CHAMBAZ und HORNING (8)), von Trimethylsilyl-Äther-Enol-Trimethylsilyl-Äthern (CHAMBAZ et al. (9)) und von Methoxim-Trimethylsilyläthern (THENOT und HORNING (68)) erfüllt.

a. Trialkylsilyläther (TMS-Äther und TMS-Enol-Äther)

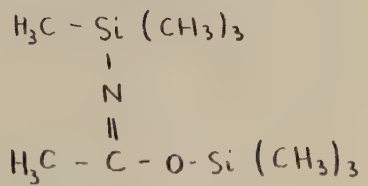
Die Silyläther entstehen gemäß Gl. (1) aus Organosiliziumhalogeniden durch nucleophile Substitution:



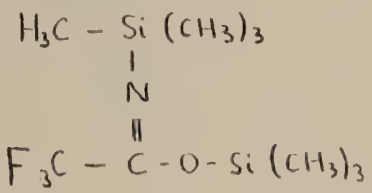
Trimethylchlorsilan
TMCS



N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
BSA

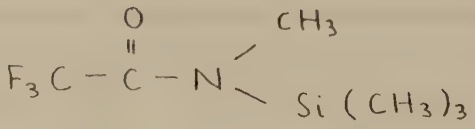


N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
BSTFA



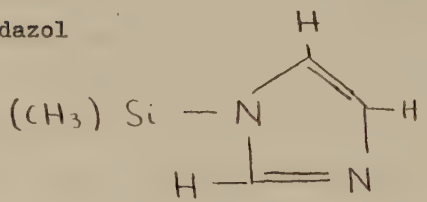
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid

MSTFA



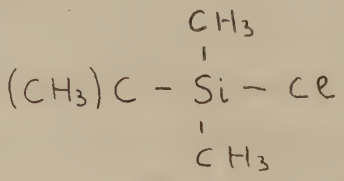
Trimethylsilylimidazol

TMSI



t-Butyldimethylsilylchlorid

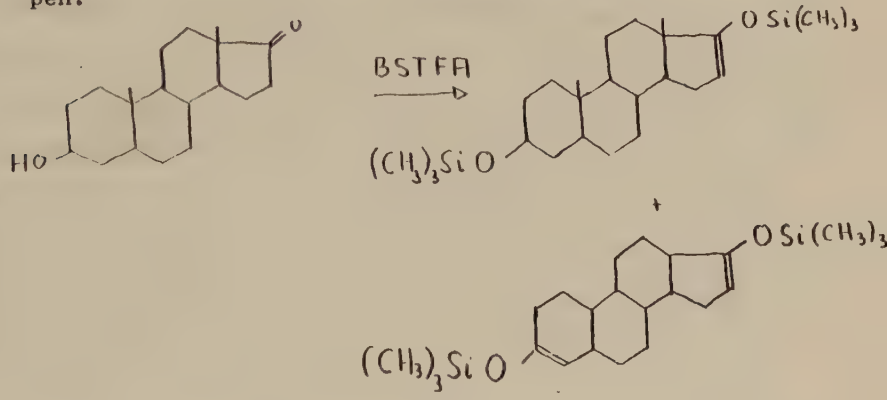
t-BDMS



Die Darstellung reiner Silyläther führt zwar zu flüchtigen Steroidderivaten mit guten gaschromatographischen Eigenschaften, weisen aber auch einige wesentliche Nachteile auf:

1) Sterisch gehinderte Gruppen werden nur langsam und nicht quantitativ derivatisiert. So wird die 17$\alpha$-OH-Gruppe vor allem von TMSI und die 11ß-Hydroxy-Gruppe nur in Gegenwart von TMCS als Katalysator umgesetzt (GLEISPACH (24)).

2) Unter energischen Reaktionsbedingungen, wie sie zur Umsetzung sterisch gehinderter Hydroxy-Gruppen erforderlich sind, kommt es zur Enolisierung von Ketogruppen:



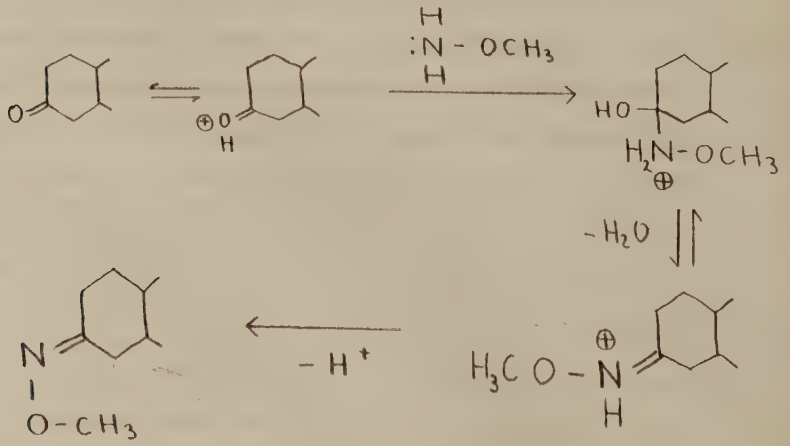

so daß möglicherweise mehrere Reaktionsprodukte entstehen können (CHAMBAZ und HORNING (8)). CHAMBAZ und Mitarb. (7) haben gezeigt, daß unter Verwendung nucleophiler basischer Katalysatoren ausschließlich silylierte Enol-TMS-Äther aus Keto-Gruppen entstehen. Anhand von Massenspektren und Kernmagnetresonanz-Spektren konnten sie zeigen, daß unter GC-Bedingungen die durch Enolisierung entstehende, zwischen $C_{20}$ und $C_{21}$ ungesättigte Seitenkette nicht abgespalten wird (CHAMBAZ et al. (9)).

3) Ein weiterer Nachteil der Trimethylsilylierung ist die Feuchtigkeitsempfindlichkeit der Steroidderivate, was

zu Zersetzungsprodukten vor allem der Corticosteroide mit Dihydroxyacetonseitenkette führt (EIK-NES und HORNING (15)). Die Empfindlichkeit der Trimethylsilyläther gegenüber protischen Lösungsmitteln hat zur Entwicklung stabilerer Alkylsilyl-Derivate geführt. Vor allem die t-BDMS-Derivate von Steroiden sind relativ unempfindlich (COREY und VENKATESWARLU (10)) und haben gute gaschromatographische und massenspektroskopische Eigenschaften (PHILLIPOU et al. (52), de JONG et al. (36)). Die Steroide werden mit t-Butyldimethylsilylchlorid in 3α, 3β, 17α, 17β, 20α- und 21-Stellung quantitativ zu t-BDMS-Äther umgesetzt. Die 20β-Hydroxygruppe reagiert nur langsam. Sterisch gehinderte Hydroxygruppen, vor allem in 11- und 17-Stellung reagieren dagegen auch nicht unter forcierten Bedingungen.

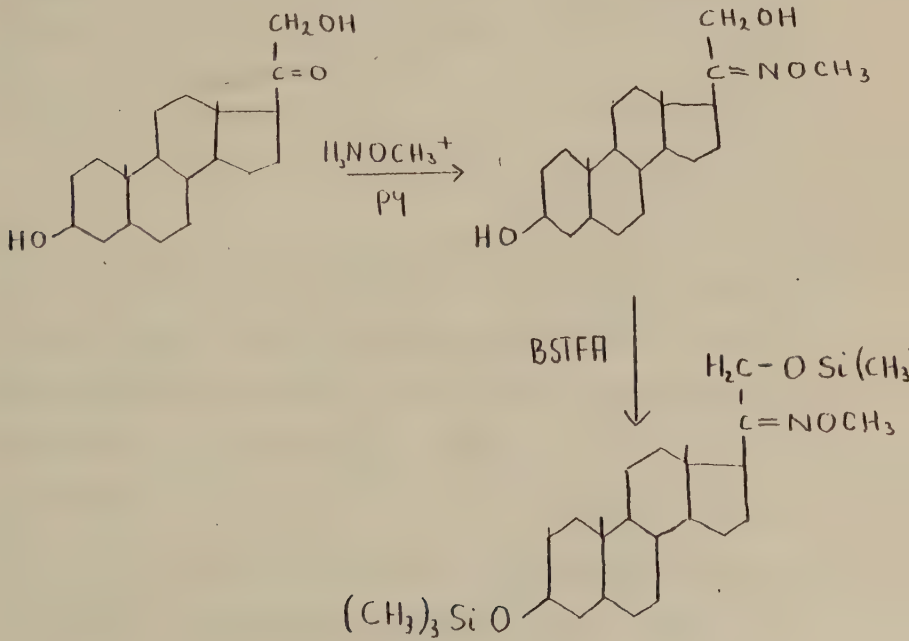
b. Methoxim-Trimethylsilyläther (MO-TMS-Äther)

Ketogruppen von Steroiden können mit Methoxyaminhydrochlorid in Methoxime (= O-methylierte Steroidoxime) umgesetzt werden (HORNING et al. (31))



Die Methoximderivate der Steroide sind für die gaschromatographische Trennung nicht geeignet, da sie erst unter solchen Temperaturen flüchtig sind, in denen BECKMANN-Umlagerung zu ungesättigten Nitrilen erfolgt (THENOT und HORNING (68)). Der Nutzen der Methoxim-Bildung liegt darin, daß durch die Ketogruppe bei nachfolgender Silylierung vor Enolisierung geschützt wird. Dadurch können zur Trimethylsilylierung forciertere Reaktionsbedingungen gewählt werden, unter denen die Silylierung auch sterisch gehinderter Gruppen möglich wird.

Die so erhaltenen Derivate von Steroiden mit Dihydroxyaceton-Seitenkette sind unter GC-Bedingungen stabil (GARDINER und HORNING (20)).



Die in den gereinigten Extrakten enthaltenen Steroide wurden sowohl zu MO-TMS-Äthern wie auch zu TMS-Enol-Äthern umgesetzt und diese hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für die in der vorliegenden Arbeit referierten Methode untersucht. Die beiden Derivatisierungsverfahren wurden außerdem im Hinblick auf ihr reaktionskinetisches Verhalten untersucht.

A.4.1. Darstellung der MO-TMS-Steroidäther

Der bei 30° C unter dem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampfte Steroidextrakt wurde mit 200 µl einer in Pyridin gesättigten Lsg. von Methoxyaminhydrochlorid versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von zwölf Stunden bei Raumtemperatur wurde das Pyridin unter dem Stickstoffstrom abgeblasen und das Reaktionsprodukt (im wesentlichen O-methylierte Steroidoxime) mit

1. 100 µl BSTFA
2. 100 µl BSTFA und 5 mg Kaliumacetat als Katalysator
3. 100 µl BSTFA und 10 µl TMCS als Katalysator

silyliert. Die Ansätze wurden jeweils in einem geschlossenen Spitzglas bei 70° C (mit Ausnahme der temperaturabhängigen reaktionskinetischen Untersuchungen) in einem Aluminiumblock während zwei Stunden zur Umsetzung gebracht.

A.4.2. Darstellung der TMS-Enol-TMS-Äther

Der unter einem Stickstoffstrom getrocknete Steroidextrakt

wurde mit 100 µl BSTFA und 5 mg Kaliumacetat als Katalysator unter Luftabschluß bei 70° C (Aluminiumblock) zwei Stunden umgesetzt. Für die reaktionskinetischen Untersuchungen mit THE und BSTFA mit und ohne TMCS oder Kaliumacetat als Katalysatoren waren Reaktionszeit und Temperatur wechselweise variabel.

## B. Gaschromatographische Trennung der Harnsteroide

Die hier angewandte gaschromatographische Trennmethode lehnt sich eng an die von GROB (26,27), GROB und GROB jr. (28) und GROB jr. und NEUKOHM (29) beschriebenen Arbeitsmethoden an. Im einzelnen wurden die folgenden Verfahrensweisen angewandt:

### B.1.1. Probeneingabe durch Direkteinspritzung

Darunter wird eine Einspritzung der Probe ohne Stromteilung verstanden. Dabei wird die Probe auf einem Einspritzblock verdampft, der keinen anderen Ausgang für Gase bietet als die Kapillarsäule. Da die Gasströmung in einer Glaskapillarsäule gering ist, würde ein Wegfall der Stromteilung zu erheblicher Verbreiterung der peaks führen. Diese Verbreiterung wird dadurch verhindert, daß zum Zeitpunkt der Probenaufgabe die Glaskapillare unter der Temperatur gehalten wird, bei der die Analyse durchgeführt werden soll. Die

nach Verdampfung in die Glaskapillare einströmende Substanz wird dort in einer kurzen Zone aufkondensiert. Bei dieser Aufgabetechnik ist es wichtig, daß eine möglichst geringe Lösungsmittelmenge im Einspritzblock verdampft wird. Bei größeren Volumina würden große Druckschwankungen an der Kapillarsäulenspitze entstehen, und es wäre nötig, die Probenaufgabe innerhalb eines bestimmten Zeitraums verzögert vorzunehmen. Solches Vorgehen ließe sich aber nur mit erheblichem technischem Aufwand so automatisieren, daß reproduzierbare Ergebnisse entstehen.

### B.1.2. Einfluß des Septums

Der Einspritzblock des Gaschromatographen ist nach außen durch ein Kunststoffseptum abgeschlossen, das vor dem Einspritzen der Probe durchstochen werden muß.

Das Septum stellt eine erhebliche Fehlerquelle dar:

a) Am Septum, zumeist aus siliconhaltigem Material, wird der im Einspritzteil entstehende Dampf teilweise adsorbiert, und seine Bestandteile werden verzögert abgegeben, was zu Verzerrungen der peaks ("tailing") und zu Artefakten führen kann.

b) Die gleichmäßige Freisetzung von sogenannten "Weichmachern" aus dem Plastikmaterial führt bei Anwendung von Temperaturprogrammen zu "Geisterpeaks" und Verschiebung der Grundlinie ("base line drift").

c) Bei jedem Durchdringen der Nadel durch das Septum wird ein Plastikpartikel herausgerissen und gelangt während der Injektion in das Verdampfersystem. Die Ansammlung von zersetzten Septumpartikeln im Verdampferblock stellt insbesondere bei Anwendung der direkten Einspritztechnik eine erhebliche Fehlerquelle dar.

Die Störmöglichkeit c) kann nur durch Einspritztechniken umgangen werden, die ohne Septum auskommen. Dies ist einmal durch den von GROB und GROB jr. (28) angegebenen "on-column-injector" möglich (siehe Abb. B.1.2.1). Dabei wird die Nadel nicht durch ein Septum gestochen, sondern durch einen 0,3 mm engen Kanal in den Verdampfer geführt. Der Kanal ist durch ein Nadelventil verschließbar.

Eine andere Möglichkeit stellt das Feststoffinjektionssystem nach LUYTEN und RUTTEN (46) dar, das in ähnlicher Weise erstmals von ROS (54) beschrieben wurde. Dabei wird die gelöste Probe auf einen zur Spitze ausgezogenen Glasstab innerhalb eines geschlossenen, mit dem Verdampfer verbundenen Systems aufgedampft. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft ist, wird die Glasspitze mit dem Kondensat durch eine elektromagnetische Mechanik in das Injektionssystem gebracht, wo die Probe in die Gasphase übergeführt wird.

Dieses Versuchskonzept wurde von mehreren Autoren schon vor fünfzehn Jahren, allerdings nicht immer in Kombination mit Glaskapillaren, angewandt (ROS (54), ROS und SOMMERVILLE (55),

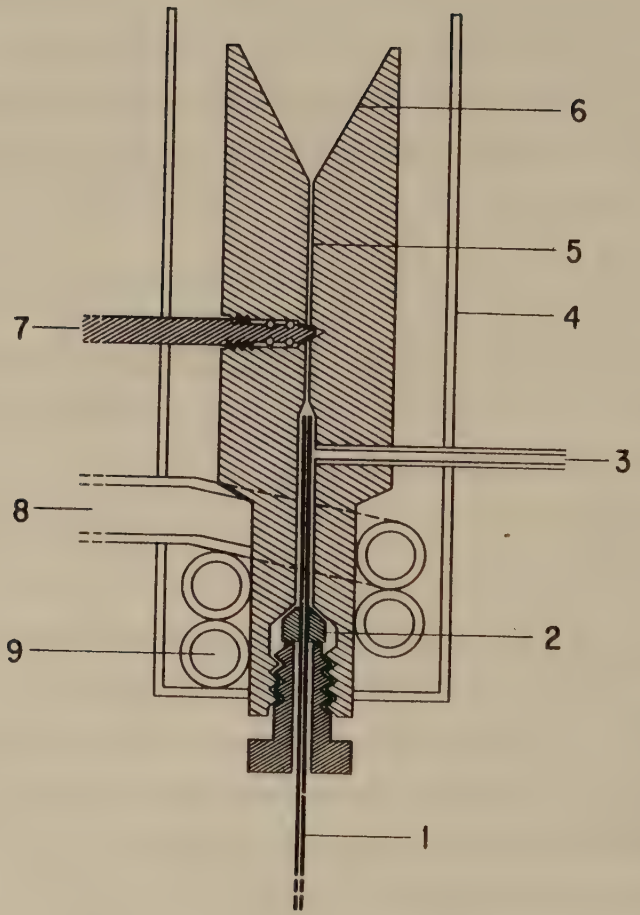



Abb. B.1.2.1.

Schema eines septumfreien sog. "on-column"-Injektors nach GROB und GROB jr. (28)

BAILEY et al. (2), SHACKLETON et al. (61), LEUNISSEN und THIJSSEN (44) und TAYLOR und SHACKLETON (65)).

Eine andere für die klinische Routine wichtige Methode wurde von POY und Mitarb. (53) vorgestellt. Dabei werden die derivatisierten Proben in Kapillaren aufgezogen, das Lösungsmittel verdampft, und anschließend gleiten die Kapillaren mittels eines automatisch betriebenen Probengebers in den Injektorblock. Mit diesem vollautomatischen GC-Probengebersystem lassen sich die Nachteile der Probeneinspritzung, wie Septumeinflüsse und Zersetzung im heißen Verdampferraum an Metalloberflächen vermeiden und gleichzeitig eine große Probenzahl analysieren.

Die unter c) genannten Fehlerquellen lassen sich nur durch septumfreie Techniken vermeiden. Die anderen durch das Septum bedingten störenden Einflüsse können durch die von GROB (27) beschriebene Septumspülung wirksam vermindert werden. Dabei wird das Septum durch einen von der sonstigen Gasversorgung unabhängigen Nebenstrom mit Gas gespült, das nicht mehr in den Verdampferraum gelangt (siehe Abb. B.1.2.2.).

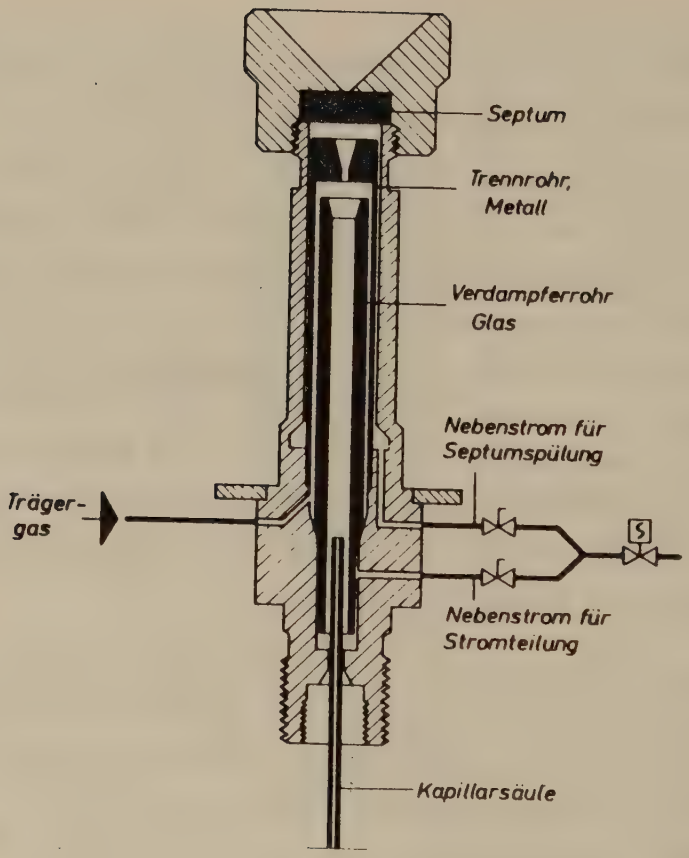



Abb. B.1.2.2.

Schema eines Verdampfersystems mit Septumspülung nach GROB (27)

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Gaschromatogramme durch Injektion im Derivatisierungsmittel gelöster Steroidderivate in einem dem Schema der Abb. B.1.2.2. entsprechenden Injektor gemessen.

## B.2. Versuchsbedingungen bei der gaschromatographischen Analyse

Der Geräteofen, der die Glaskapillarsäule (25 - 36 m, Phase OV 101) enthielt, wurde mittels eines Gebläses auf 60° C abgekühlt. Von der Steroid-MO-TMS- bzw. TMS-Enol-TMS-Ätherlösung wurden 0,3 - 0,5 µl mit Hilfe einer Injektionsnadel auf den Verdampferblock aufgespritzt. Nach einer Minute wurde das Stromteilungsventil so geöffnet, daß 15 ml Wasserstoff pro Minute unabhängig vom konstanten Wasserstoff-Trägergasfluß (etwa 3 ml/min) als Septumspülung ausströmen konnten.

Die Ofentemperatur wurde mit 3° C/min von 60° auf 170° C erhöht und folgendes Temperaturprogramm geschaltet:
15 Min. isotherm bei 170° C, dann Temperatursteigerung mit 1° C pro Minute bis 220° C und weitere 18 Minuten isotherm bei 220° C.
Die GC-Signale wurden mit einem Flammenionisationsdetektor erhalten, der bei einem Wasserstoffdurchfluß von 28 ml/min und einer Temperatur von 250° C maximale Empfindlichkeit aufwies. Die Signale wurden auf einem XY-Schreiber registriert.

## B.3. Auswertung der GC-Signale

### B.3.1. Qualitative Auswertung der GC-Signale

Bei dem vorgegebenen Temperaturprogramm (siehe B.2.) wurden authentische Steroid-MO-TMS-Äther gemeinsam mit unverzweigten Alkanen, die ähnliche Retentionszeiten haben, chromatographiert. Einem Steroid, das zwischen zwei sich um einen $C_2H_4$-Alkylrest unterscheidenden Alkanen eluiert wurde, konnte man gemäß der Methode von SCHOMBURG und DIELMANN (56) eine Methyleneinheit zuordnen. In Tabelle B.3.1. sind die Methyleneinheiten (MU = methylene unit) der wichtigsten in dieser Arbeit referierten Harnsteroide, sowie die Variationskoeffizienten nach zehnmaligem Aufspritzen aufgeführt. Zur Überprüfung der Identität einer einem GC-Signal mit Hilfe der Methylen-Einheiten zugeordneten Substanz wurden authentische Steroide bei Wiederholungsmessungen mitchromatographiert und anhand der Konstanz der Halbwertsbreite die Richtigkeit der Zuordnung abzusichern versucht. Weiterhin wurde in einer Reihe von Untersuchungen die Struktur der zu den GC-peaks gehörenden Steroidderivate mittels Massenspektroskopie ermittelt. Dazu stand das Massenspektrometer Varian MAT 311 zur Verfügung. Die Glaskapillare des zur Trennung verwendeten Gaschromatographen war direkt an das Massenspektrometer gekoppelt. Die Massenspektren wurden mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen.

| | Steroid-MO-TMS-Äther | Methyleneinh. | SD |
|---|---|---|---|
| 1 | Androsteron | 25,30 | 0,30 |
| 2 | Etiocholanolon | 25,45 | 0,30 |
| 3 | Dehydroepiandrosteron | 26,25 | 0,25 |
| 4 | 11-Ketoandrosteron | 26,55 | 0,35 |
| 5 | 11-Hydroxiandrosteron | 26,95 | 0,35 |
| 6 | 11-Hydroxietiocholanolon | 27,05 | 0,30 |
| 7 | Pregnandiol | 27,20 | 0,40 |
| 8 | 17α-Hydroxypregnanolon | 27,75 | 0,20 |
| 9 | Pregnantriol | 28,20 | 0,15 |
| 10 | Pregnantriolon | 29,25 | 0,25 |
| 11 | Tetrahydrocortison | 29,95 | 0,35 |
| 12 | Tetrahydrocortisol | 30,65 | 0,40 |

Tabelle B.3.1.

Methylen-Einheiten (MU-Werte) von zwölf Harnsteroiden, sowie die Standardabweichungen nach zehnmaligem Aufspritzen

B.3.2. Quantitative Auswertung der GC-Signale

Bei der quantitativen Auswertung von FID-Signalen ist folgendes zu berücksichtigen: Die Fläche des registrierten Signals ist sowohl von der am peak-Maximum gemessenen Retention wie auch von der Symmetrie der Elutionszone für eine gegebene Substanzmenge in weiteren Grenzen unabhängig. Die peak-Höhe dagegen wird bei gleicher Substanzmenge kleiner, wenn die Breite des peaks auf Grund längerer Retentionszeiten

bei gleichbleibender Ofentemperatur zunimmt. Daher sollten für die Chromatogrammauswertung nur die peak-Flächen herangezogen werden.

Bei Anwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID) ist die peak-Fläche, die eine im Detektor ionisierte Substanz erzeugt, abhängig von

1. der Geometrie des Detektors
2. der Detektortemperatur
3. der Oberflächenbeschaffenheit des Detektors und
4. der Art der Substanz (Geometrie, funktionelle Gruppen).

Da während des Meßvorgangs 1. - 3. konstant gehalten werden, ist die Substanzmenge (M), die die Trennkapillare verläßt, proportional dem in der Wasserstoffflamme des FID gemessenen Ionenstrom und damit der auf dem XY-Schreiber registrierten Fläche

$$M = R_i \int y_i dt$$

Der Proportionalitätsfaktor $R_i$ wird "response-factor" genannt. Er berücksichtigt den individuellen Einfluß eines Moleküls auf die Anzeigeempfindlichkeit des Detektors. Da die Response-Faktoren zwischen den einzelnen Steroidderivaten erheblich variieren, wurden für jedes einzelne Steroid Eichkurven ermittelt.

Dabei wurden die 17-Oxo-Steroide auf das physiologisch zumindest mit dieser Technik nicht in meßbarer Konzentration

vorkommende 5α-Androstan 3β,17β-diol und die sich vom Pregnan ableitenden Steroide auf Cholesterylbutyrat als Standard bezogen. Würden alle Steroide nur auf einen internen Standard bezogen, z.B. auf Cholesterylbutyrat, so würden sich die Retentionszeiten etwa von Androsteron und Etiocholanolon von der des Standards um über eine Stunde unterscheiden. Die Halbwertszeiten würden dabei erhebliche Differenzen aufweisen, so daß eine quantitative Auswertung nur mit Hilfe eines automatischen Integrators möglich gewesen wäre. Durch Verwendung von zwei internen Standards kann in guter Näherung davon ausgegangen werden, daß

$$M = R_i \, h_i$$

ist, wobei $h_i$ die peak-Höhe zur Zeit t ist, die über einen weiten Meßbereich hinweg proportional der peak-Fläche ist.

## C. Ergebnisse und Diskussion

### C.1. Vergleich der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden

Wie in A.3. beschrieben wurden bei drei der vier untersuchten Extraktionsmethoden (A.3.1., A.3.3. und A.3.4.) die Aufarbeitungsverluste durch Messung der mitgeführten radioaktiven Standards $^{3}$H-Dehydroepiandrosteron ($^{3}$H-DHEA) und im Parallelversuch $^{3}$H-Tetrahydrocortisol ($^{3}$H-THF) kontrolliert.

Die Methode A.3.1. ist auf reine Lösungsmittelextraktion beschränkt. VÖLLMIN (70,71) wandte die von CURTIUS und MÜLLER (11) beschriebene Ätherextraktion an und erhielt Steroidextrakte, die nach Silylierung direkt aufgespritzt werden konnten. Dabei wurden halbquantitativ Steroidprofile erhalten, die allein auf Grund ihres Musters für bestimmte Steroidsynthesestörungen wie 21-Hydroxylase-Mangel oder einem Defekt der 3ß-Dehydrogenase-Isomerase pathognomonisch waren. Auch ROS und SOMMERVILLE (55) wandten die Ätherextraktion an und untersuchten die Steroidprofile bei Frauen in verschiedenen Zyklusphasen oder Erkrankungen der Ovarien. Die Variationskoeffizienten, die dabei für die einzelnen Steroide angegeben werden, liegen zwischen 7,6% und 2,6%. Die Reproduzierbarkeit bei acht unabhängigen Bestimmungen der gleichen Urinprobe war nach Verwendung von Äthylacetat als Lösungsmittel mit Variationskoeffizienten zwischen 7% und 25% wesentlich schlechter.

Ein weiteres allein auf Lösungsmittelextraktion beruhendes Verfahren wurde in der Arbeitsgruppe von HORNING entwickelt und auf zahlreiche physiologische und pathologische Steroidstoffwechselveränderungen angewandt (GERMAN et al. (22), HORNING et al. (31), PFAFFENBERGER et al. (51)). Dabei wird die Urinprobe nach der enzymatischen Spaltung mit Dichlormethan und anschließend mit Essigsäureäthylester extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt, wie in A.3.1. beschrieben, durch Ausschütteln mit Waschlösungen. Der GC-Analyse geht Umsetzung der Harnsteroide zu MO-TMS-Äther voraus.

Wie aus Tabelle C.1.1. hervorgeht, sind die Wiederfindungen bei Methode A.3.1. für polare und unpolare Steroide etwa gleich groß (92 und 93 %). Ein Vergleich der Variationskoeffizienten der elf in Tabelle C.1.2. aufgeführten Steroide ergibt Variationskoeffizienten zwischen 6,5% und 21,6%. Die Chromatogramme, die nach dieser Aufarbeitungsweise erhalten werden, sind von guter Qualität, was sich sowohl in der stabilen Grundlinie wie auch in der geringen Anzahl nicht identifizierbarer "Geister-peaks" äußert. Das Verfahren hat aber zwei wesentliche Nachteile:

1. Es ist für die Anforderungen eines auf größere Probenzahl ausgerichteten Labors zu umständlich.
2. Die Lösungsmittelextraktion führt in vielen Fällen zu Emulsionen, die nicht mehr gebrochen werden können, so daß ein neuer Ansatz gemacht werden muß.

Aus Tab. C.1.1. geht weiterhin hervor, daß die Methode A.3.1., also Extraktion ausschließlich mit Lösungsmitteln, verglichen mit anderen Methoden die höchsten Wiederfindungsraten wie auch die geringsten Abweichungen des polaren THF zum weniger polaren DHEA liefert. Die Gaschromatogramme der nach Methode A.3.2. aufgearbeiteten Urinproben zeigen für die polaren Steroide um über die Hälfte niedrigere peak-Höhen als bei Methode A.3.1. und über ein Drittel niedrigere als nach Anwendung von Methode A.3.3. und A.3.4. erhalten werden.

Bei dem in A.3.2. beschriebenen Verfahren geht der enzymatischen Spaltung ein Reinigungsschritt durch Extraktion von Steroid und Steroidkonjugat an dem neutralen Adsorberharz Amberlite XAD-2 voraus (BRADLOW (4)). Dieser Reinigungsschritt wurde vor allem von SHACKLETON und Mitarbeitern (SHACKLETON et al. (58,59,61) und TAYLOR et al. (65)), aber auch anderen Arbeitsgruppen übernommen (SETCHELL et al. (65), VIINIKAA und JÄNNE (69) und GUSTAVSON und ERIKSSON (30)). Dabei erwies sich die der enzymatischen Spaltung vorausgehende Abtrennung kleiner Moleküle und vor allem der als Enzyminhibitoren wirksamen anorganischen Ionen als vorteilhaft. BRADLOW (5) wies auf die Probleme dieser Methode bei der Wiederfindung polarer Konjugate hin und schlug eine zusätzliche Modifikation vor, wobei die Konjugate in ihre Triäthylaminderivate umgewandelt werden sollen. Die Nachteile des von BRADLOW beschriebenen Verfahrens wurden

von MATSUI und Mitarbeitern (48) bestätigt, die nachwiesen, daß sich vor allem die Steroiddikonjugate dem quantitativen Nachweis bei dieser Methode entziehen.

Da bei der Methode A.3.2. der enzymatischen Spaltung ein Reinigungsschritt vorausgeht, uns aber keine radioaktiven $^{3}$H-DHEA und $^{3}$H-THF-Konjugate zur Verfügung standen, wurde hierbei die Wiederfindungsrate indirekt bestimmt. Es wurden dabei die radioaktiven Steroide nach der Vorreinigung zugegeben und die Signalhöhen, die nach Anwendung der Methode A.3.2. erhalten wurden, auf die nach Methode A.3.4. (= 100%) erhaltenen bezogen.

Überlegen war die Methode A.3.2. den anderen Extraktionsverfahren, wenn die niederpolaren 17-Oxo-Steroide bestimmt werden sollten. Dabei spielen die Verluste polarer Steroidkonjugate keine Rolle, während die durch Reinigung von Enzyminhibitoren vollständige enzymatische Spaltung gewährleistet ist (GRAEF und FUCHS (25)).

| Extraktions-methode | [$^3$H] -DHEA Aktivität | VK | [$^3$H] -THF Aktivität | VK |
|---|---|---|---|---|
| A.3.1. | 92 | 18 | 93 | 21 |
| A.3.2. | 119 | 6 | 61 | 15 |
| A.3.3. | 87 | 12 | 82 | 16 |
| A.3.4. | 82 | 8 | 84 | 12 |

Tab. C.1.1.

Wiederfindungen (% der eingesetzten Aktivität) von $^3$H-DHEA und $^3$H -THF nach vier verschiedenen Extraktionsverfahren, sowie Variationskoeffizienten (VK) nach zwölf Versuchsansätzen.(A.3.1.= 1.enzymat.Spaltung,2.Lsgsmittelextr.,3.Ausschütteln mit Waschlsg. A.3.2.= Extraktion an XAD-2,2.enzymat. Spaltung,3.Lsgsmittelextr.,4.Ausschütteln mit Waschlsg.A.3.3.= 1.enzymat.Spaltung,2.Extraktion an XAD-2, 3.Nachreinigen an Amberlyst A-26.A.3.4.= 1.enzymat.Spaltung 2.Extraktion an XAD-2,3.Ausschütteln mit Waschlsg.)

Die Möglichkeit, an Stelle der Reinigung des Lösungsmittelextrakts von Säuren mit Natriumhydrogencarbonat ein basisches Austauscherharz (Amberlyst A-26) zu verwenden, kommt bei Methode A.3.3. zur Anwendung. Dieses Vorgehen wurde erstmals von SHACKLETON (58) empfohlen und hat folgende Vorteile: Es kommen keine Reinigungsschritte vor, die zu einem Verlust polarer Steroide in die wäßrige Phase führen können; weiterhin erspart die Methode Arbeitszeit, gestattet den Einsatz geringer Harnvolumina und kann leicht automatisiert werden. Wie aus Tab. C.1.1. hervorgeht, sind die

| Steroid | Methode | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A.3.1. | | A.3.2. | | A.3.3. | | A.3.4. | |
| | cm | VK | cm | VK | cm | VK | cm | VK |
| A | 8,7 | 6,9 | 10,2 | 4,5 | 7,8 | 8,9 | 7,9 | 5,1 |
| E | 8,5 | 6,5 | 11,4 | 5,5 | 7,7 | 10,5 | 8,1 | 6,6 |
| DHEA | 8,8 | 10,9 | 12,2 | 6,7 | 7,5 | 13,7 | 8,0 | 7,0 |
| 11-Oxo-A | 7,8 | 15,5 | 10,8 | 12,3 | 8,1 | 15,6 | 7,8 | 9,5 |
| 11-OH-A | 8,2 | 12,3 | 11,2 | 8,8 | 7,9 | 12,7 | 8,2 | 12,5 |
| P'diol | 5,2 | 16,4 | 3,2 | 12,5 | 4,5 | 20,8 | 4,6 | 16,6 |
| 17 $\alpha$OH P | 4,8 | 17,7 | 2,8 | 14,8 | 4,3 | 25,7 | 4,4 | 15,8 |
| P'triol | 5,2 | 19,6 | 2,5 | 16,6 | 4,4 | 28,9 | 4,2 | 16,5 |
| P'triolon | 5,7 | 18,1 | 2,6 | 14,4 | 4,2 | 30,4 | 4,1 | 14,3 |
| THE | 5,1 | 20,4 | 2,2 | 16,5 | 4,7 | 33,7 | 4,4 | 17,7 |
| THF | 5,3 | 21,6 | 1,9 | 18,6 | 4,3 | 36,5 | 4,4 | 18,6 |

Tab. C.1.2.

Peak-Höhen, wie sie für 11 Harnsteroide aus der gleichen Untersuchungsprobe nach vier verschiedenen Aufarbeitungsmethoden ermittelt wurden. Die Peak-Höhen sind in cm relativ zu Androstandiol (= 10 cm) bei 17-Oxo-Steroiden und relativ zu Cholesterylbutyrat (= 5cm) bei den Steroiden, die sich vom Pregnan ableiten, berechnet. Die Steroide wurden als MO-TMS-Äther unter Standardbedingungen analysiert.

Wiederfindungen von $^{3}$H-DHEA und $^{3}$H-THF befriedigend. Die Variationskoeffizienten für die Reproduzierbarkeit der individuellen Steroidmengen in Tab. C.1.2. lagen zwischen 8,94 und 33%. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der mangelhaften Reinheit der Probe. So fanden sich nach wiederholter Injektion im Einspritzblock bzw. am Anfangsteil der Kapillare schwerflüchtige Ablagerungen. Diese Verunreinigungen haben Adsorption der zu analysierenden Steroid-MO-TMS-Äther und demzufolge bei den GC-Signalen "tailing" zur Folge, das bei der hier verwendeten quantitativen Auswertungsmethode zu schlechter Reproduzierbarkeit führt. Von TAYLOR und SHACKLETON (66) wurde in Anlehnung an SETCHELL und Mitarb. (57) nach Extraktion an Amberlite XAD-2 und Reinigung an Amberlyst A 15 ($H^{+}$-Form) eine Separation der Konjugate an Diäthylaminohydroxypropyl-Sephadex LH 20 vorgenommen. Auch der der enzymolitischen Spaltung folgenden Extraktion an Amberlite XAD-2 wurde eine Extraktion an Sephadex LH 20 zur Fraktionierung und Reinigung nachgeschaltet. (GUSTAFSSON und ERIKSSON (30), SHACKLETON et al. (61), TAYLOR et al. (65) und TAYLOR und SHACKLETON (66)).

Die Methode A.3.4. vereinigt einige Vorzüge der beschriebenen Verfahren. Der Extraktion geht die enzymatische Spaltung voraus, so daß ein Verlust an polaren Konjugaten vermieden wird. Dies ist immer dann vorteilhaft, wenn auf eine fraktionierte Analyse freier und konjugierter Steroide verzichtet wird. Außerdem kann durch Extraktion freier Steroide

an XAD-2 Säulen auf die umständliche und durch Emulsionsbildung teilweise unbrauchbare Lösungsmittelextraktion mit Methylenchlorid und Essigsäureäthylester verzichtet werden. Die Lösungsmittelextraktion mit Diäthyläther, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, ist wegen der besonderen Risiken beim Umgang mit Äther nur speziell dafür ausgestatteten Labors vorbehalten. Schließlich wurden durch die in dieser Methode beschriebenen Nachreinigungen durch Ausschütteln mit Waschlösungen sehr saubere Extrakte erhalten. Wie aus Tabelle C.1.1. und C.1.2. zu ersehen, sind die nach diesem Verfahren erhaltenen Wiederfindungen für $^{3}$H-DHEA und $^{3}$THF als auch die Variationskoeffizienten der bei wiederholtem Analysengang gefundenen Steroidmengen mit Werten zwischen 5,1% und 18,6% zufriedenstellend.
Wenn nicht anders vermerkt, wird im folgenden Text die Methode A.3.4. als Standardmethode referiert.

## C.2. Reaktionskinetische Untersuchungen bei verschiedenen Derivatisierungsmethoden

### C.2.1. Temperaturstabilität von TMS-Enol-TMS-Äther des THE

Wie in Abschnitt B.4. beschrieben, wurden bei der Derivatisierung von Steroidgemischen im wesentlichen zwei Wege eingeschlagen. Einmal die direkte Silylierung, die zu Tri-

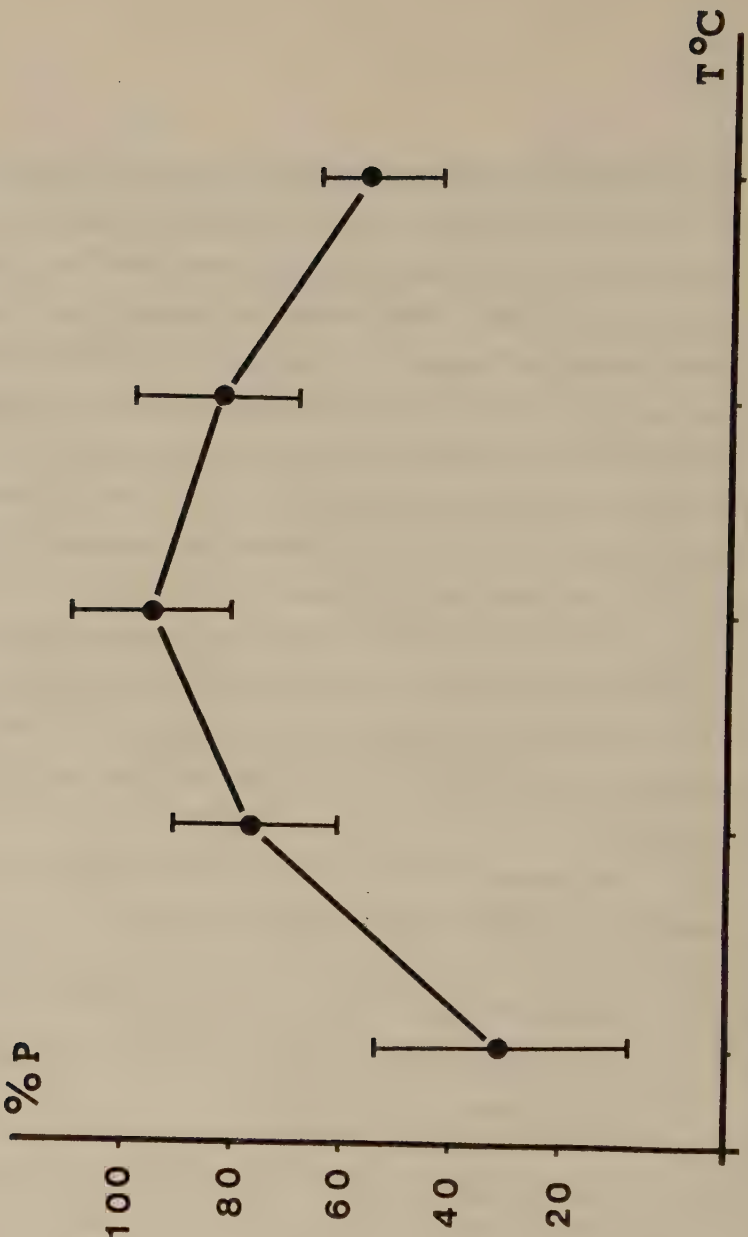



Abb. C.2.1.1.

Temperaturabhängigkeit der Produktausbeute bei der Umsetzung von THE mit BSTFA

alkylsilyläthern führt, weiterhin die Darstellung von N-methoxylierten Trimethylsilylsteroidoximen.

Die direkte Derivatisierung zu TMS-Äthern hat den Vorteil kurzer Reaktionszeit. So benötigt die Silylierung mit BSTFA lediglich ein bis zwei Stunden. Allerdings werden dabei zum Teil auch Enoläther gebildet, deren thermische Stabilität geringer ist als die gesättigter Kohlenwasserstoffderivate.

Bei der Umsetzung von THE mit BSTFA, jeweils eine Stunde bei verschiedenen Reaktionstemperaturen, zeigte sich, daß die Produktausbeute bei Temperaturen oberhalb 180° C wieder abnimmt (siehe Abb. C.2.1.1.).
Bei Temperaturen oberhalb 250° C, also etwa unter Bedingungen, wie sie im Einspritzblock und Verdampferraum vorliegen, ist die Produktausbeute nur noch 60% des Maximalwertes, der bei 160° C gefunden wurde. Auch die Gaschromatogramme von Harnaufbereitungen zeigten bei alleiniger Silylierung vor allem für diejenigen Steroide, die 17-Hydroxyacetonseitenketten haben, fehlerhaft niedrige Signalhöhen und eine erhebliche Anzahl zusätzlicher, nicht genauer identifizierbarer peaks. Auch die Derivatisierung von Steroiden mit 4-en-3-on-Gruppen führt überwiegend zu Enoläthern. In Abb. C.2.1.2. ist das Chromatogramm der Reaktionsprodukte nach der Umsetzung von Testosteron mit BSTFA abgebildet. Darin ist zu erkennen, daß neben dem $C_{17}$-TMS-Äther noch zwei isomere Enoläther enstanden sind. Die Identität der Verbindungen wurde massenspektroskopisch gesichert.

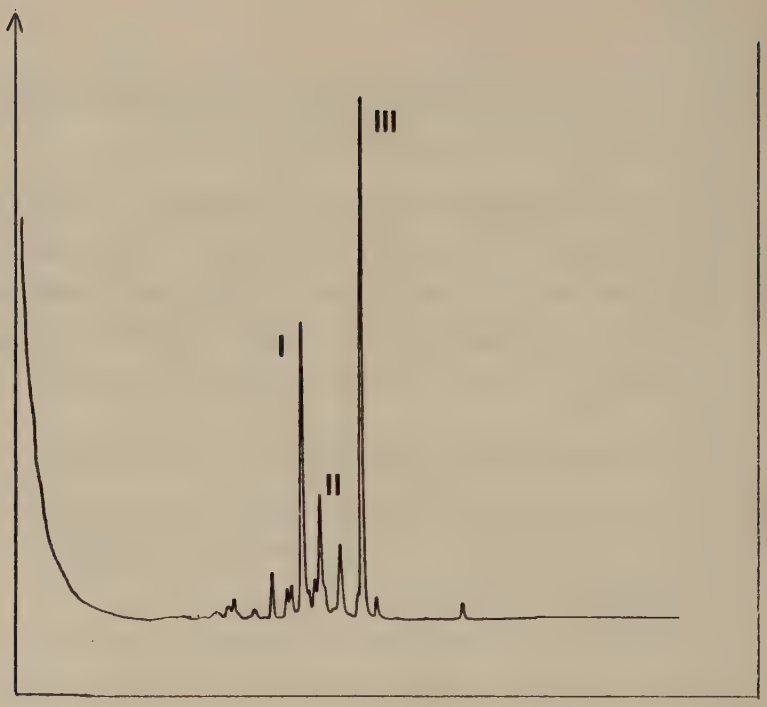



Abb. C.2.1.2.

GK-GC von Testosteron nach vierstündiger Umsetzung mit BSTFA bei 80° C. Versuchsbedingungen: Standard, Säulenphase: OV 101 I und II sind die peaks isomerer Enoläther, III entspricht dem $C_{17}$-Silyläther.

Wie CHAMBAZ und Mitarb. (7) berichten, nimmt bei hoher Derivatisierungstemperatur die Vielfalt der Endprodukte zu. CHAMBAZ und HORNING (8) weisen auch darauf hin, daß die Temperaturen im Einspritzblock ausreichen, um noch weitere unerwünschte Silylierungsreaktionen zu ermöglichen. Dies ist insbesondere dann zu berücksichtigen, wenn mit einer

metallenen Injektionsnadel die Probe eingespritzt wird. Die dabei herrschenden Temperaturbedingungen können ausreichen, um die Metalloberfläche selbst katalytisch aktiv werden zu lassen, wobei eine Vielzahl unerwarteter Nebenreaktionen induziert werden kann. Die unvollständige Umsetzung von 3-Keto-$\Delta^4$-Steroiden, wie im Falle des Testosterons aufgezeigt, stört bei der Analyse von Harnsteroiden allerdings nicht wesentlich, da nahezu ausschließlich die Tetrahydro-Metaboliten ausgeschieden werden. In der Massenspektroskopie, die in Kombination mit Glaskapillar-Gaschromatographie die derzeit vielseitigste und zuverlässigste Direktmethode in der klinischen Chemie darstellt, haben die TMS-Enol-TMS-Äther einige wichtige Vorzüge. Zum einen wird die Verschmutzung von Injektor, Säule, Ionenquelle und GC-MS-Interface vermieden. Weiterhin weisen TMS-Enol-TMS-Äther im Gegensatz zu TMS-Äthern und MO-TMS-Äthern intensivere Signale für Molekülionen auf. Dies ist auf die größere Stabilität positiver Enoläther-Steroidmolekülionen zurückzuführen.

Für die Untersuchung der Harnsteroide mittels GK-GC hat sich aufgrund der thermischen Stabilität und der einheitlichen Produktbildung die Darstellung der MO-TMS-Steroidäther unter Berücksichtigung der Probeneingabetechnik und Auswertungsweise als das am besten geeignete Derivatisierungsverfahren erwiesen (THENOT und HORNING (67,68)). Bei Probeneingabe mit Feststoffprobengeber und quantitativer Auswertung auf der Grundlage von Flächenintegralen sollte die Derivatisierung zu TMS-Enol-TMS-Äthern ausreichend sein.

## C.3. Einfluß von Katalysatoren auf die Silylierungsreaktion

### C.3.1. Trimethylchlorsilan (TMCS) als Katalysator

Der Zusatz von Katalysatoren führt gewöhnlich zu einer Steigerung der Reaktionsrate, und es wurde berichtet, daß auch sterisch gehinderte OH-Gruppen nach Zusatz von Katalysatoren silyliert werden können (CHAMBAZ und HORNING (8)). Als Katalysatoren wurde gewöhnlich TMCS verwendet, aber auch Wasser und Säuren sind katalytisch aktiv. Der Begriff Katalysator ist allerdings nur mit Einschränkungen gültig, da gezeigt wurde, daß der Einfluß des "Katalysators" TMCS auf die prozentuale Ausbeute von der Konzentration der zugesetzten Menge TMCS abhängt.

Zur Bestimmung der katalytischen Wirksamkeit wurden, wie in A.4.1. beschrieben, 50 µg THE als O-methyliertes Steroidoxim mit 200 µl BSTFA und 10 µl TMCS im Alu-Block auf 70° C erhitzt. Nach 20, 30, 40, 60, 90 und 120 Minuten wurden je 0,3 µl entnommen und gaschromatographisch quantitativ gegen mitgeführtes $C_{32}H_{66}$ (Dotriacontan) bestimmt. Wie aus Abb. C.3.1.1. hervorgeht, ist die nach zwei Stunden erzielte Ausbeute mit TMCS-Zusatz größer als ohne Katalysator. Weiterhin hat sich nach TMCS-Zusatz das Reaktionsgleichgewicht früher eingestellt. TMCS wirkt demnach nicht nur auf die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch auf die Lage des

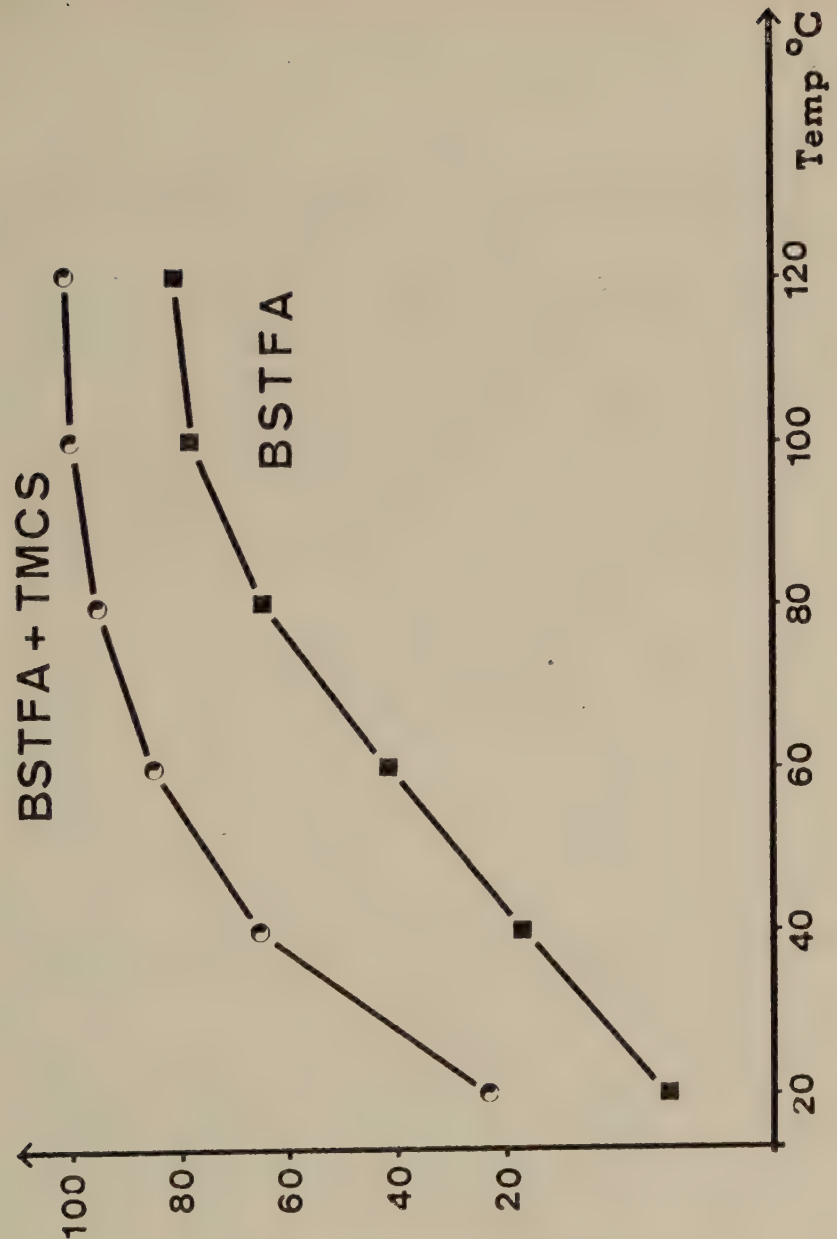
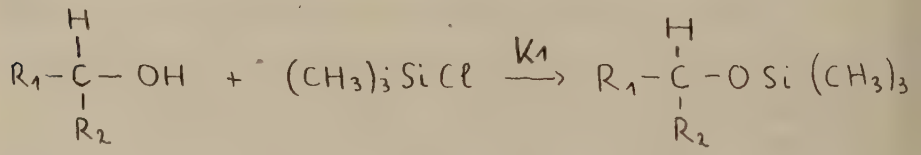
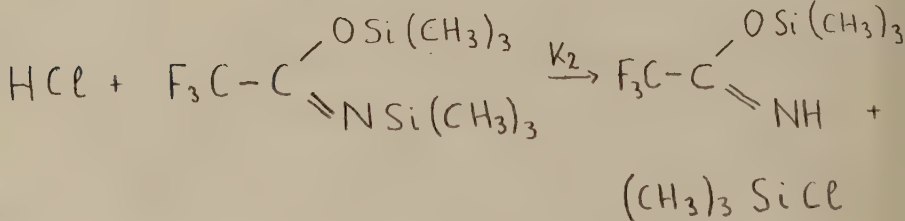


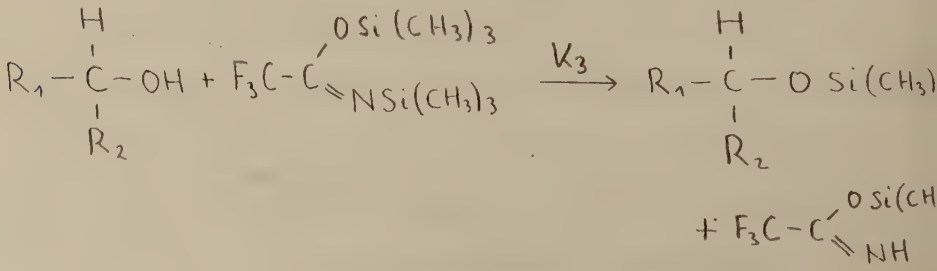

Abb. C.3.1.1.

Produktausbeute von MO-TMS-Äther des THE relativ zu $C_{32}H_{66}$ in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit und ohne TMCS-

Reaktionsgleichgewichts. Der Mechanismus der TMCS-Katalyse ist nicht völlig geklärt. Am wahrscheinlichsten beruht die Wirkung auf der Bildung labiler Zwischenprodukte, die leicht unter Rückbildung des Katalysators weiterreagieren. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die $\pi$-Akzeptororbitale am Si-Atom durch die Bindung an das Chloratom im TMCS energetisch günstiger liegen als im BSTFA, so daß für den ersten Reaktionsschritt eine geringere Aktivierungsenergie aufzuwenden ist, als dies ohne Katalysator nötig wäre ($k_3 \gg k_1$).







### C.3.2. Kaliumacetat als Katalysator

CHAMBAZ und Mitarbeiter (9) haben durch Umsetzung von Steroiden mit verschiedenen Silylierungsmitteln (BSTFA, BSA und TMCS) gezeigt, daß nucleophile Substanzen die Silylierung zu Enol-TMS-Äthern katalysieren. Die Silylierungsrate sterisch gehinderter Hydroxylgruppen blieb dabei unbeeinflußt.

Zur Untersuchung der Frage, ob auch die Silylierung O-methylierter Steroidoxime durch nucleophile Substanzen katalysiert werden kann, wurde der reaktionskinetische Einfluß von Kaliumacetat untersucht. Analog dem in C.3.1. beschriebenen Verfahren wurden 50 µg THE als MO- Derivat mit 200 µl BSTFA und 5 mg Kaliumacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde im Alu-Block auf 70° C erhitzt,und nach 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten wurden je 0,2 µl Reaktionslösung entnommen und gaschromatographisch das Reaktionsprodukt quantitativ durch Vergleich mit gleichzeitig mitgeführtem Dotriacontan ($C_{32}H_{66}$) bestimmt.

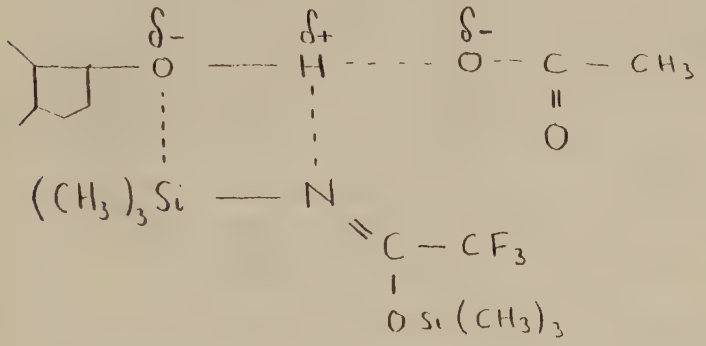
Wie Abb. C.3.2.1. zeigt, hat ebenso wie TMCS auch Kaliumacetat einen katalytischen Effekt. Im Gegensatz zu TMCS hat die Katalyse mit Kaliumacetat allerdings keinen Einfluß auf die Einstellung des Reaktionsgleichgewichts, sondern lediglich auf die Geschwindigkeit, mit der sich dieses Gleichgewicht einstellt.

Der Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten Silylierung der Steroidoxime läßt sich am besten durch einen Übergangs-

Abb. C.3.2.1.

Produktausbeute der Bildung von MO-TMS-Äthern des THF relativ zu Dotriacontan ($C_{32}H_{66}$) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit und ohne Kaliumacetatkatalyse

zustand erklären, bei dem eine positive Partialladung am Wasserstoff der Hydroxylgruppe verstärkt wird. Damit wird der elektrophile Angriff der Silyl-Gruppe auf den Hydroxyl-Sauerstoff erleichtert (Siehe Abb.).



Da bei basenkatalysierter Umsetzung von O-methylierten Steroidoximen mit Kaliumacetat bei verkürzter Reaktionszeit zu guten Ausbeuten führt und dabei keine Nebenprodukte entstehen, die den weiteren Analysengang stören könnten, wurde bei den meisten Umsetzungen diese Reaktion gewählt.

## C.4. Qualitative Auswertung der GK-GC-Signale

Für die zwölf untersuchten Harnsteroide ergaben sich nach dem in B.3.1. angegebenen Verfahren Methyleneinheiten, die gut mit den in der Literatur angegebenen Daten übereinstimmen (siehe Tab. C.4.1.). Dabei ist zu beachten, daß sowohl die verwendete Trennphase, wie auch die Wahl des Temperaturprogrammes und andere Versuchsvariable die Vergleichbarkeit

| Steroid | eigene | (46) | zit(22) | (2) | (66) | zit(51) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Androsteron | 25,30 | 25,32 | 25,30 | 24,57 | | 25,32 |
| Ätiocholanolon | 25,45 | 25,44 | 25,45 | 24,74 | | 25,46 |
| DHEA | 26,25 | 25,96 | 25,99 | 25,26 | | |
| 11-Oxo-A | 26,55 | | 26,33 | 25,37 | | |
| 11-OH-A | 26,95 | 27,21 | 27,19 | 26,71 | | |
| 11-OH-E | 27,05 | 27,34 | 27,32 | 26,92 | | |
| P'diol | 27,20 | 27,85 | 27,86 | 27,78 | | |
| 17-OH-P | 27,75 | | | | | |
| P'triol | 28,20 | 28,20 | 28,19 | 29,16 | | |
| P'-triolon | 29,25 | | | | | |
| THE | 29,95 | 29,77 | 29,77 | | 29,70 | |
| THF | 30,65 | 30,39 | 30,38 | | 30,24 | 30,34 |

Tab. C.4.1.

Vergleich der Methyleneinheiten von zwölf Harnsteroiden durch GK-GC-Analyse, ermittelt von verschiedenen Autoren

der MU-Werte einschränkt. Die Identität der einzelnen Steroide wurde außer durch Co-Injektion authentischer Proben und Vergleich der Halbwertsbreiten durch Aufnahme der Massenspektren sichergestellt. Dabei wurden anhand der Molekülionen und der Massenfragmente die mit Hilfe der MU-Werte getroffenen Zuordnungen überprüft. Weiter wurden folgende Beobachtungen gemacht:

a) Die Unterscheidung von Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydroepiandrosteron mit Hilfe der Retentionszeiten gelingt einfacher als an Hand der Massenspektren (siehe Abb. C.4.1. und C.4.2.)

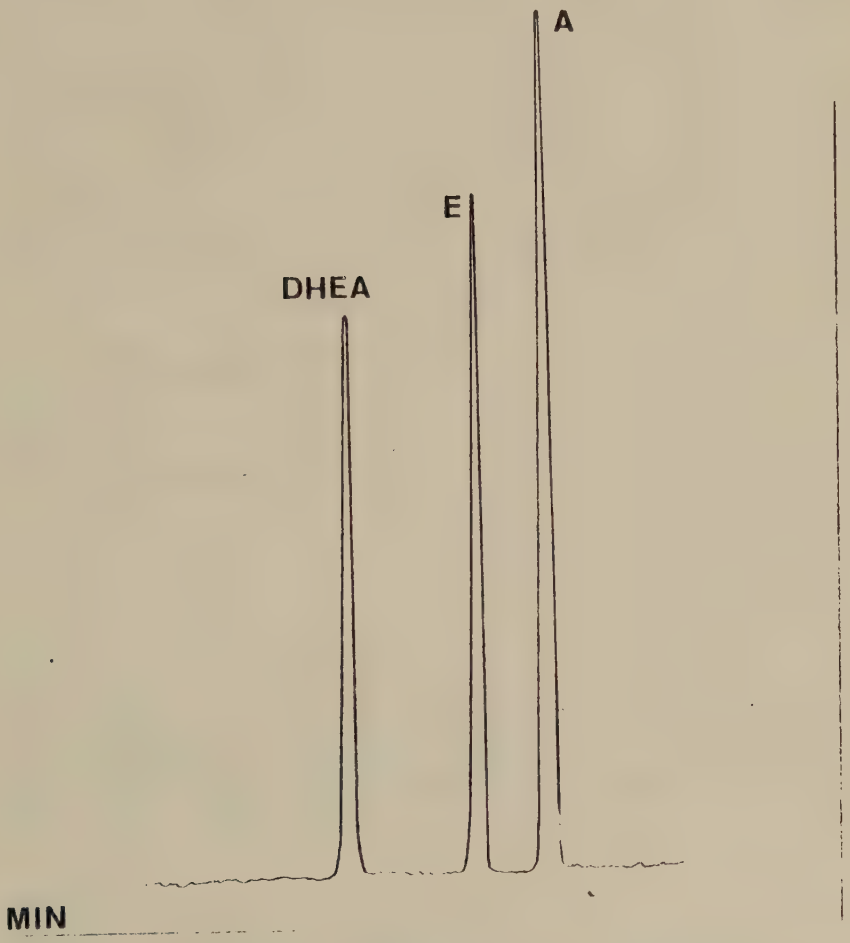



Abb. C.4.1.

Chromatogramme von MO-TMS-Steroidäthern von Androsteron (A), Ätiocholanolon (E) und Dehydroepiandrosteron (DHEA)

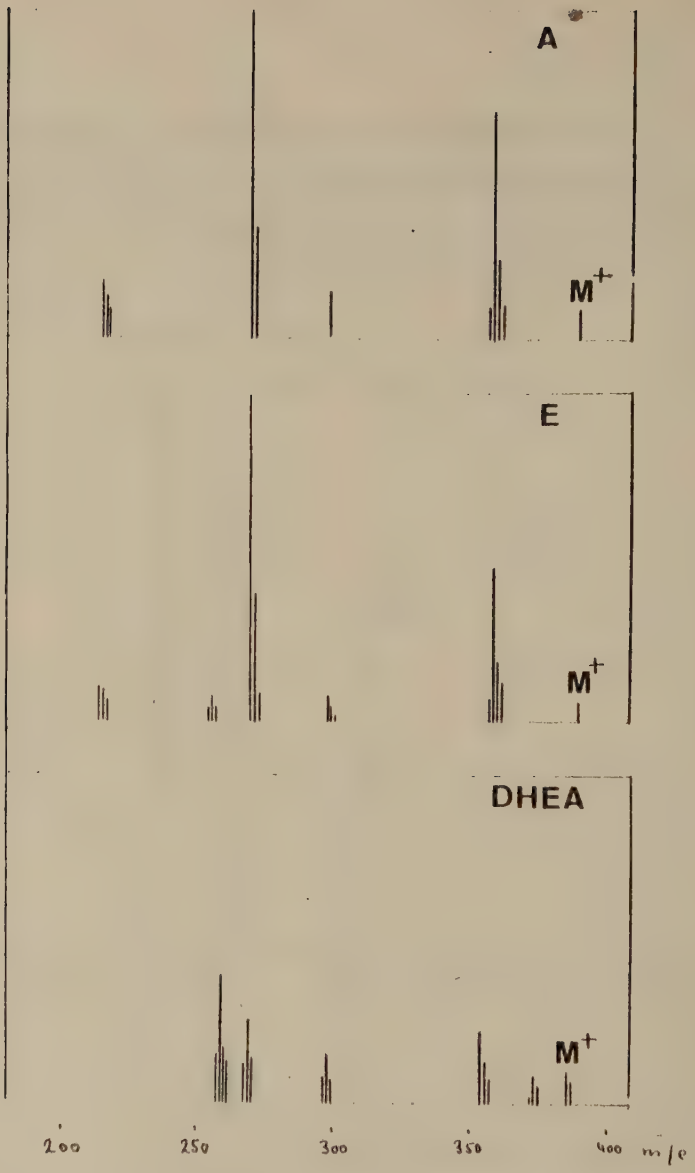



Abb. C.4.2.

Massenspektren der MO-TMS-Äther von Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydroepiandrosteron, bestimmt aus einem durch GK-GC getrennten Gemisch der drei Steroide

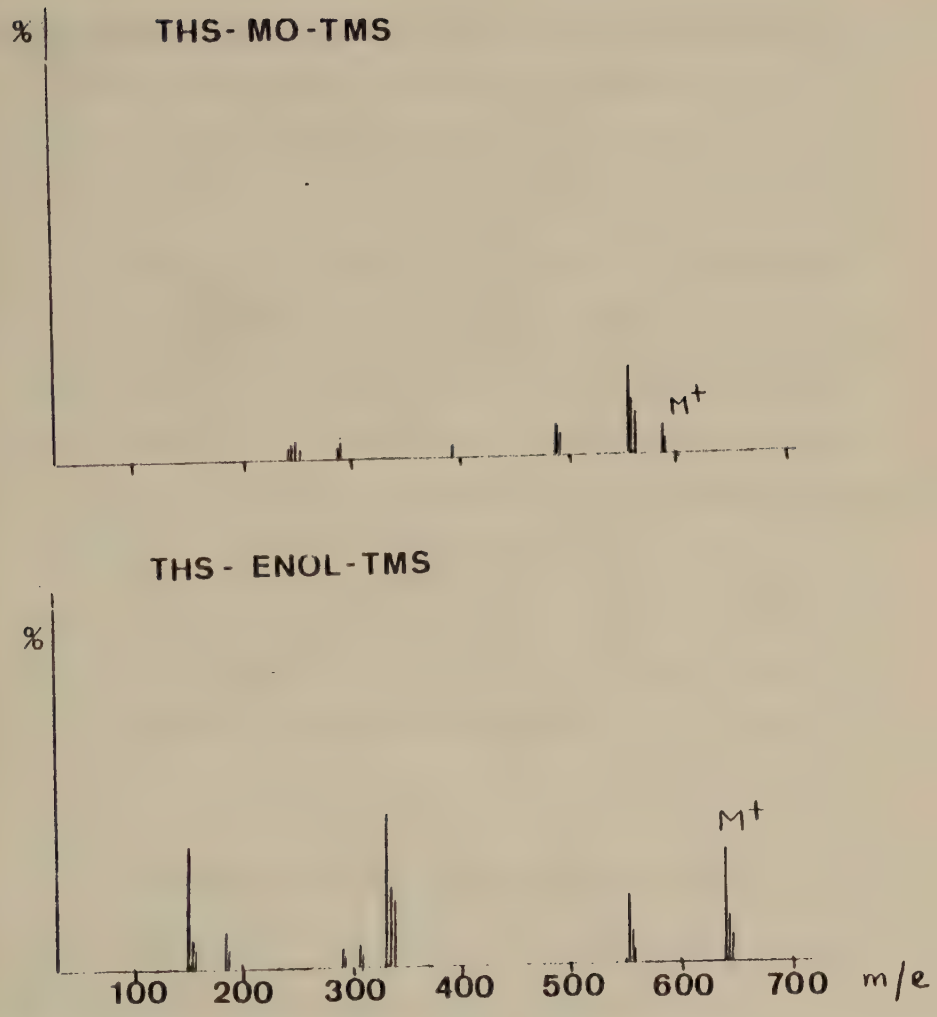



Abb. C.4.3.

Massenspektren (70 eV) der MO-TMS- und TMS-Enol-TMS-Äther von Tetrahydrodesoxycortisol (THS)

b) Ein Vergleich der Massenspektren des TMS-Enol-TMS-Äthers von Tetrahydrodesoxycortisol (THS) mit denen des MO-TMS-Äthers zeigt die besseren massenspektroskopischen Eigenschaften des TMS-Enol-TMS-Derivates (siehe Abb. C.4.3.).

Daraus ist zu folgern, daß zur massenspektroskopischen Strukturaufklärung TMS-Enol-TMS-Äther besser geeignet sind als MO-TMS-Äther. Steroidstrukturen, die sich lediglich durch Asymmetrie am $C_5$-Kohlenstoffatom unterscheiden, wie die cis/trans-Isomeren Androsteron und Ätiocholanolon, sind massenspektroskopisch nur schwer zu unterscheiden. Dies trifft vor allem dann zu, wenn biologische Proben untersucht werden, bei denen in den meisten Fällen nicht näher definierbare Signale geringer Intensität unterlagert sind. Auf die Retentionszeit und damit die Methyleneinheiten wirkt sich die cis/trans-Isomerie zwischen Ring A und Ring B wesentlich mehr aus.

## C.5. Quantitative Auswertung der GK-GC-Signale

Bei der Analyse der peak-Höhen führen sowohl geringfügige Verzerrungen der Signalform, wie sie durch Überlastung der Säule entstehen ("leading"), als auch durch Schwankungen der Retentionszeiten zu erheblichen Fehlern bei der quantitativen Auswertung. Die nachfolgende Diskussion der quantitativen Harnsteroidbestimmungen stützt sich auf die Aufarbeitungsmethode A.3.4. und Standard-GC-Bedingungen.

Infolge der unterschiedlichen Wechselwirkung der zu untersuchenden Steroid-MO-TMS-Äther gegenüber der stationären Phase (in den meisten Fällen OV-101) und auch wegen stets vorhandenen adsorptionsaktiven Verunreinigungen sind konstante Signalgeometrien über die gesamte Länge eines Chromatogramms meist nicht zu erhalten. Da die Geometrie benachbarter peaks stets größere Ähnlichkeit aufweist als die entfernter, wurden zwei interne Standards mit unterschiedlichen Retentionsverhalten mitgeführt (siehe B.3.2.). Die 17-Ketosteroide wurden auf das physiologisch nicht vorkommende 3ß-17ß-Androstandiol und Steroide mit 17α-Hydroxyaceton-Seitenkette auf Cholesterylbutyrat bezogen. Die Variationskoeffizienten bei zwölf aufeinanderfolgenden Messungen der gleichen Aufarbeitung (siehe Tab. C.5.1.) sind bei zwölf aufeinanderfolgenden Messungen der gleichen Aufarbeitung bei Verwendung zweier interner Standards besser als bei Verwendung eines einzigen.

Auf die Vorteile der Verwendung zweier Standards wiesen schon ROS und SOMMERVILLE (55), BAILEY et al. (2) und CURTIUS et al. (12) hin. SHACKLETON et al. (60,61) und TAYLOR et al. (65) haben die Anwendung zweier Standards modifiziert, indem sie das Verhalten der peak-Höhen auf die Höhe der Verbindungslinie der Signal-Maxima zweier interner Standards (5α-Androstan 3α, 17α-diol und Cholesterylbutyrat) bezogen. FANTL und GRAY (16) haben die Präzision der Ergebnisse bezogen auf peak-Höhen mit ein oder zwei internen Standards mit der auf peak-Flächen bezogenen verglichen. Dabei

| Steroid | | 1-11 bezogen auf IS 2 | 1-5 bezogen auf IS 1 | Lit. (16) | Lit. (63) | Lit. (55) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | (1) | 11,5 | 2,7 | 10,7 | --- | 2,6 |
| E | (2) | 10,7 | 2,2 | 9,4 | 3,1 | 2,9 |
| DHEA | (3) | 12,5 | 1,9 | 6,3 | 5,3 | 3,6 |
| 11-O-A | (4) | 14,2 | 6,7 | --- | --- | 5,4 |
| 11-OH-A | (5) | 15,5 | 9,2 | --- | --- | 4,2 |
| P'diol | (6) | 16,6 | --- | 6,4 | 9,4 | 2,7 |
| 17-OH-P | (7) | 15,8 | --- | --- | --- | --- |
| P'triol | (8) | 16,5 | --- | 6,8 | 7,3 | 6,1 |
| P'triolon | (9) | 15,3 | --- | --- | --- | --- |
| THE | (10) | 19,7 | --- | 3,5 | 2,6 | --- |
| THF | (11) | 20,6 | --- | 3,2 | 2,6 | --- |
| A'diol | | --- | IS 1 | --- | --- | --- |
| Cholbut. | | IS 2 | --- | IS | --- | IS |

Tabelle C.5.1.

Variationskoeffizienten der Steroid/interner Standard-Quotienten, wie sie nach zwei verschiedenen Methoden erhalten werden. In Spalte 1 sind alle elf Steroide auf die peak-Höhe von Cholesterylbutyrat bezogen. In Spalte 2 sind Steroid 1-5 auf Androstandiol bezogen. In Spalte 3 sind die auf Cholesterylbutyrat bezogenen Quotienten nach FANTL und GRAY (16), in Spalte 4 die nach der Methode von SHACKLETON et al. (63) und in der letzten Spalte die nach ROS und SOMMERVILLE (55) erhaltenen Werte.

stellten sie fest, daß der Quotient Steroid/Cholesterylbutyrat beim Vergleich der peak-Höhen mit den peak-Flächen wesentlich von der Qualität der Säule abhängt. Auf einer neuen Säule guter Qualität unterscheiden sich die Variationskoeffizienten nicht wesentlich, während auf einer alten Säule, bei der die peak-Form durch "tailing" verzerrt war, die Genauigkeit der auf peak-Höhen bezogenen Daten erheblich nachgelassen hatte. Dabei fanden sich umso größere Variationskoeffizienten, je weiter die Signale der miteinander korrelierten Steroide auseinanderlagen. Aus Tabelle C.5.1. geht hervor, daß bei Verwendung von peak-Höhen bei der quantitativen Analyse der Bezug auf zwei interne Standards die besseren Ergebnisse sowohl bei den eigenen Untersuchungen als auch bei den in der Literatur referierten lieferte.

Die Bestimmung absoluter Steroidkonzentrationen im Harn erfordert die Ermittlung von sogenannten Response-Faktoren. Diese tragen der Tatsache Rechnung, daß verschiedene Steroide bzw. deren MO-TMS-Derivate unterschiedlichen Einfluß auf die Anzeigeempfindlichkeit des Registriersystems haben. Dabei wurde derart vorgegangen, daß Eichkurven für die einzelnen Steroide mit authentischen Proben ermittelt wurden. Die auf Grund der MU-Werte identifizierten Steroide mußten dann anhand der individuellen Eichkurven nach Höhenausmessung zunächst mit der Höhe des internen Standards verglichen werden. Als Bezugshöhen der Standards wurden für IS 1 (= Androstandiol, 10 mg in 100 ml Äthanol) 10 cm und für

| Steroid | A | | B | |
|---|---|---|---|---|
| | X (mg/d) | VK (%) | X (mg/d) | VK (%) |
| A | 58,1 | 5,1 | 55,5 | 2,7 |
| E | 64,2 | 6,6 | 64,2 | 2,2 |
| DHEA | 22,4 | 7,6 | 19,8 | 1,9 |
| 11-O-A | 24,2 | 8,5 | 27,2 | 6,7 |
| 11-OH-A | 8,2 | 12,4 | 11,4 | 9,2 |
| P'diol | 26,1 | 16,6 | 32,2 | 18,2 |
| 17-OH-P | 54,2 | 15,8 | 64,2 | 12,4 |
| P'triol | 93,5 | 16,5 | 109,5 | 18,6 |
| P'triolon | 34,2 | 15,3 | 49,3 | 19,5 |
| THE | 5,6 | 19,7 | 4,2 | 19,5 |
| THF | 8,4 | 20,6 | 6,3 | 19,6 |

Tabelle C.5.2.

Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei einmaligem Aufspritzen zehn verschiedener Aufarbeitungen des gleichen Urins nach Methode A.3.4. (Spalte A) und die nach zehnmaligem Aufspritzen einer einzigen Aufarbeitung erhaltenen Werte (Spalte B). Die Steroide oberhalb der Querlinie sind auf Androstandiol (IS 1) und die restlichen auf Cholesterylbutyrat (IS 2) als interne Standards bezogen.

IS 2 (= Cholesterylbutyrat, 10 mg in 100 ml Äthanol) 5 cm gewählt. Die im Chromatogramm gemessene Höhe für ein individuelles Steroid, z.B. Androsteron, mußte also zunächst auf die Sollhöhe des peaks von Androstandiol (IS 1) gleich 10 cm umgerechnet werden. Aus dieser auf IS 1 = 10 cm (ergo IS 2 = 5 cm) umgerechneten Höhe konnte mit Hilfe der Eichkurven das chromatographierte Androsteron mengenmäßig erfaßt werden. Die Tagesausscheidung errechnete sich dann unter Bezug auf die ausgeschiedene Tagesmenge und den zur Analyse verwendeten Anteil davon.
Die Reproduzierbarkeit von zehn Bestimmungen des gleichen Urins (µg/24h) auf der Grundlage jeweils eines Chromatogramms ist in Tabelle C.5.2. zusammengefaßt.

Ein Vergleich der Reproduzierbarkeit der Werte bei zehnmaligem Aufspritzen der gleichen Aufarbeitung mit den Ergebnissen, die bei einmaliger Messung von zehn verschiedenen Aufarbeitungen des gleichen Urins erhalten werden, zeigt keine wesentlichen Unterschiede in den Qualitätsmerkmalen (siehe Tab. C.5.1., Spalte 2, und Tab. C.5.2.). Daraus muß gefolgert werden, daß Verfeinerungen der Aufarbeitungsweise der Harnproben nicht zur wesentlichen Verbesserung der Genauigkeit der Gesamtmethode führen würde. Wesentliche Steigerung der Genauigkeit der Gesamtmethode ist von der Probeneingabe in das GC-System zu erwarten. Dabei haben sich vor allem Feststoffprobengeber bewährt, bei denen die Nachteile der Probeneinspritzung in Lösung,wie Septumeinflüsse und Zersetzung im heißen Verdampfer an Metalloberflächen vermieden werden (siehe Abschnitt B.5.2.).

## D. Anhang: Material und Geräte

### Steroide:

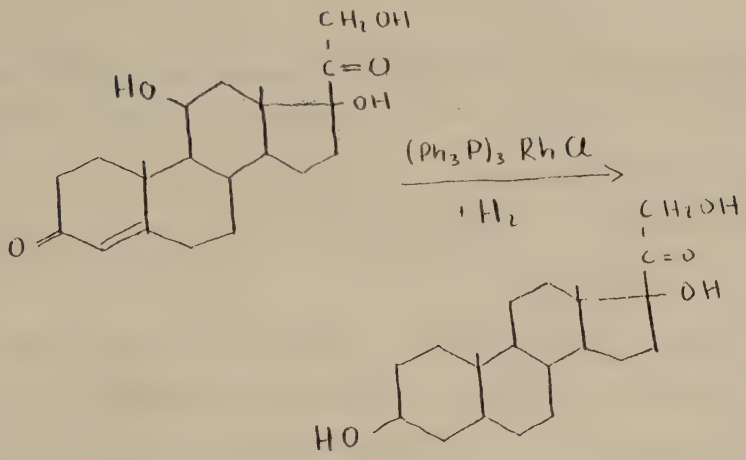
Die verwendeten Steroide wurden bei den Firmen Ikapharm (Israel), Steraloids (Wilton, USA) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Die Referenzsteroide wurden in absolutem Äthanol gelöst (500 µg/10 ml), bei 8° C aufbewahrt, und ihre Reinheit wurde durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektroskopie überprüft.

Die radioaktiven Steroide [$^3$H]-Dehydroepiandrosteron (79 Ci/mmol) und [$^3$H]-Cortisol (48 Ci/mmol) wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

### Darstellung von [$^3$H]-Tetrahydrocortisol:

Die Darstellung des radioaktiven $^3$H-THF erfolgt nach dem von OSBORNE et al. (50) und JARDINE et al. (35) beschriebenen Verfahren der homogenen katalytischen Hydrierung von Olefinen mit Tris(triphenylphyosphin)rhodium(I)-chlorid.




Dabei wird [$^3$H]-Cortisol in Äthanol gelöst und nach Zugabe von 1 mg $(Ph_3P)_3RhCl$ unter Wasserstoff bei Normaldruck und Raumtemperatur eine Stunde mit einem elektromagnetisch angetriebenen Teflonstab unter strengem Sauerstoffausschluß gerührt. Diese Darstellungsmethode wurde mit nicht radioaktivem Cortisol und gaschromatographischer Analyse der Reaktionsprodukte ausgetestet.

Chemikalien:

Dichlormethan, Trichlormethan, Essigsäureäthylester, Methylalkohol, Äthylalkohol, Aceton und Pyridin (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) waren absolut trocken und analysenrein.

N, O-Bis-(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamid (BSTFA) und Trimethylchlorsilan (TMCS), (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland).
Methoxyaminhydrochlorid (Eastman, USA).
Alkane: $C_nH_{2n+2}$ n = 24,26,28,30,32 und 34 (Serva, Heidelberg, Deutschland).
Amberlite XAD-2, mesh 300 µ - 1000 µ (Serva, Heidelberg).
Amberlyst A-26 (Serva,Heidelberg, Deutschland).
Waschlösungen: (1) natriumalkalische (5% $NaHCO_3$ und 10% NaCl) und (2) kalt gesättigte NaCl-Lösung in über Kaliumpermanganat destilliertem Wasser.

Enzyme:

Verdauungssaft der Helix Pomatia, vorwiegend ß-Glucuronidase/Arylsulfatase-Lösung (Boehringer, Mannheim, Deutschland); 1 ml enthält 5,2 IU ß-Glucuronidase ($38^\circ$ C, Phenolphtaleinmonogrucorunid als Substrat) und 14 IU Arylsulfatase ($25^\circ$ C, p-Nitrophenylsulfat als Substrat).

Glasgerät:

Die Extraktion des Rohurins erfolgte in einer eigens hierfür angefertigten Schüttelbirne, bei der Einfüllstutzen und Auslaß exzentrisch angebracht sind, so daß die Extraktion in Translation erfolgen kann.
Dies hat den Vorteil geringerer Emulsionsbildung, ohne daß die verschiedenen Phasen während des Extraktionsvorgangs fortwährend Kontakt mit Auslaßhahn und Einfüllstutzen haben.

Die weiteren Reinigungsschritte wurden in Schütteltrichtern manuell durchgeführt.

Zur Derivatisierung dienten konisch zugespitzte Reagenzgläser mit NS 14,5 Normalschliffstopfen und einem Fassungsvermögen von 20 ml.

Alle Glasgeräte mit Ausnahme der Chromatographiersäulen wurden in Chromschwefelsäurebädern gereinigt und bei 500° C mehrere Stunden ausgeheizt (KNORR (41)).

Säulenchromatographie:

5 g Amberlite XAD-2 wurden nacheinander mit jeweils 50 ml Methylalkohol, Aceton und destilliertem Wasser gewaschen, in destilliertem Wasser aufgeschlämmt und in die Chromatographiersäulen (40 cm Länge und 12 mm innerer Durchmesser) eingefüllt. Die überstehende Wassersäule wurde mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde abgelassen.

Von dem Ionenaustauscherharz Amberlyst A-26 wurden 4 g in 30 ml einer 0,1 n methanolischen NaOH-Lösung aufgeschlämmt, in die Chromatographiersäule eingebracht und bei einer Tropfgeschwindigkeit von 10 ml/min solange mit der 0,1 n NaOH-Lösung nachgewaschen, bis das Eluat farblos war. Das Austauscherharz wurde anschließend mit Methanol neutral gewaschen.

Gaschromatographie:

Die GC-Messungen wurden an einem Fractovap 2300 Gaschromatographen (Carlo Erba, Mailand, Italien,c/o Erba Science, Hofheim, Deutschland) durchgeführt. Als Säulenmaterial dient eine 25 m Säule (LKB, München, Deutschland), innerer Durchmesser 0,30 mm, mit SE-30 als stationärer Phase und eine 36 m-Säule (innerer Durchmesser 0,35 mm) mit OV 101 beschichtet (Fa. Jäggi, Trogen, Schweiz). Nachgereinigter Wasserstoff dient als Trägergas (3 ml/min), Spülgas (15 ml/min) und gemeinsam mit Luft (28 ml/min) als Brenngas (30 ml/min) für den Flammenionisationsdetektor. Die hier angegebenen Gasflüsse sind nur Richtzahlen und müssen auf maximale Empfindlichkeit justiert werden.

Messung der Radioaktivität:

Die Messung der [$^{3}$H]-Aktivität der markierten DHEA- und THE-Standards wurden mit dem Betascint 5000 Scintillationsspektrometer (Berthold und Frieseke, Wildbad, Deutschland) gemessen. Als Scintillatorflüssigkeit diente die Fertigpräparation Quickscint 402 (Zinsser, Deutschland). Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden 50 µl des in 200 µl einer Benzol-Äthylalkohol-Lösung (10:1) aufgenommenen Extrakts in ein Zählröhrchen gegeben, das 10 ml der Scintillatorflüssigkeit enthielt.

# II. ANWENDUNGSBEISPIELE FÜR DIE GLASKAPILLAR-GASCHROMATOGRAPHIE IN DER STEROIDANALYTIK

## A. Literaturüberblick

Die Anwendung der GK-GC-Technik in der Steroidanalytik erstreckt sich auf all diejenigen Bereiche der Medizin, wo es gilt, Veränderungen des Steroid-Stoffwechsels zu beurteilen.

Harnsteroidprofile von gesunden Männern und Frauen wurden von zahlreichen Autoren mitgeteilt (GUSTAFSSON und ERIKSSON (30), HORNING et al. (31), VIINIKKA und JÄNNE (69), LUYTTEN und RUTTEN (46) und FANTL und GRAY (16). Von HORNING et al. (31) wurde ein geschlechtsabhängiges Verhältnis von Androsteron zu Ätiocholanolon und von THF zu allo-THF beobachtet. Bei Frauen ist das Verhältnis von A zu E gleich 1 : 2, bei Männern dagegen umgekehrt A : E = 2 : 1. Das Verhältnis THF : allo-THF = 3 : 1 bei Frauen und bei Männern dagegen THF : allo-THF = 1 : 1. Die Quotienten dieser Steroidmetaboliten wurden als indirekte Indikatoren der 5α-H- bzw. 5β-H-Oxidoreduktase von Testosteron bzw. Cortisol angesehen und bei Frauen Abweichungen der anhand der Quotienten A:E und THF:allo-THF bestimmten Enzymaktivitäten mit dem Risiko, an Brustveränderungen zu erkranken, in Verbindung gebracht (PFAFFENBERGER et al. (51)). Besonderes Augenmerk

richteten ROS und SOMMERVILLE (55), BAILEY et al. (2) und VIINIKKA und JÄNNE (69) auf die unterschiedlichen Steroidprofile bei Frauen im Verlauf des mensuellen Zyklus. Über die Bestimmung neutraler Steroide mittels GK-GC während der Gravidität berichteten JÄNNE und VIKKO (33). Zahlreiche pathologische Steroidprofile bei Störungen der Nebennierenrinden- oder Ovarialfunktion sind von HORNING et al. (31), GERMAN et al. (22) und von ROS und SOMMERVILLE (55) beschrieben worden. Bei Frauen mit sog. idiopathischem Hirsutismus zeigen mehr als 50% der Fälle 10- bis 100-fach erhöhte Ausscheidung von Dehydroepiandrosteron (EGGER et al. (13)). LUDWIG-KÖHN et al. (47) wandten bei Patienten mit psoriasis vulgaris das von AXELSON und SJÖVALL (1) angegebene GC-MS-Verfahren an und fanden ein erhöhtes Verhältnis von Androstandiol zu DHEA.

Besonderes Interesse hat die Anwendung der GK-GC-Technik in der pädiatrischen Endokrinologie erfahren (VÖLLMIN und CURTIUS (70)). Vor allem Erkrankungen, bei denen adrenale Enzymdefekte zu gestörter Cortisolbiosynthese führen, sind dabei von besonderem klinischen Interesse, weil sie frühzeitig zur Störung der sexuellen Differenzierung führen (KNORR (41)). Die häufigste Form des genbedingten Pseudohermaphroditismus femininus wird durch die verschiedenen Formen des adrenogenitalen Syndroms (AGS, englisch: CAH = congenital adrenal hyperplasia) verursacht (LEE et al (42)). Durch 21-Hydroxylase-Defekt, seltener 11-Hydroxylase-Defekt, wird vermindert Cortisol sezerniert, was zu vermehrter

Produktion von hypophysärem ACTH führt. Dabei hyperplasiert die Nebennierenrinde, und es kommt zu vermehrter Bildung von Androgenen, was bei Mädchen bereits antenatal zur partiellen bis kompletten Virilisierung des äußeren Genitale führt. Ist die Aldosteron-Biosynthese mitbetroffen, spricht man von adrenogenitalem Salzverlustsyndrom, bei intakter Mineralocorticoidsynthese von unkompliziertem AGS. Die Ätiologie dieser Erkrankung wurde aufgedeckt, nachdem BUTLER und MARRIAN (6), MASON und KEPLER (49) und BONGIOVANNI (3) erhöhtes Pregnantriol als pathognomonisch für diese Erkrankung erkannten. Diese Beobachtung stand in Einklang mit der Vermutung von JAILER (34), daß die Ursache für das Auftreten eines AGS in einem Enzymdefekt zwischen 17$\alpha$-Hydroxyprogesteron und Cortisol liegt. Seit Einführung moderner gaschromatographischer Techniken und der radioimmunologischen Bestimmungsmöglichkeiten kleinster Steroidkonzentrationen im Plasma ist die Diagnose und Therapieüberwachung von Patienten mit AGS heute klinisch-chemische Routine (KNORR (41), LEE (42)).

Die Vorteile der hochauflösenden Glaskapillar-Gaschromatographie haben die Kenntnis über die bei Störung der sexuellen Differenzierung möglicherweise zugrunde liegenden Steroidstoffwechselstörungen erweitert. VÖLLMIN und CURTIUS veröffentlichten 1970 erstmals GK-GC-Steroidprofile eines männlichen Patienten mit AGS und wiesen auf die erhöhte Ausscheidung von Pregnantriol und Pregnantriolon hin, was mit den auf gepackten Säulen erhaltenen Befunden übereinstimmte

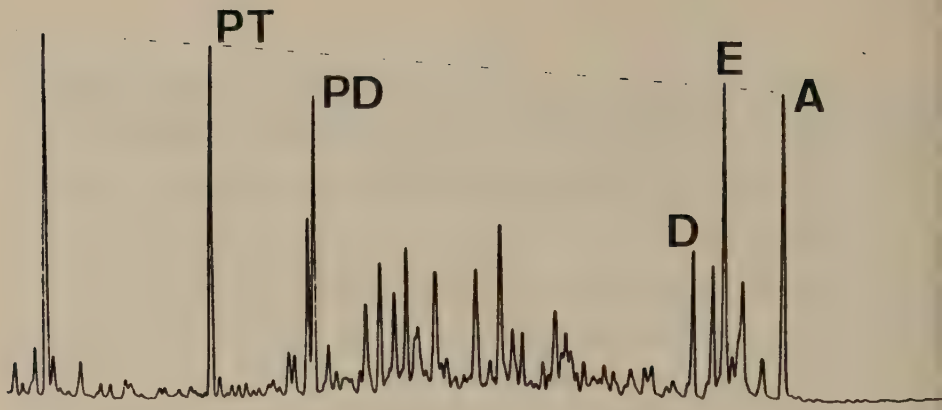
(FINKELSTEIN (17)). Über ähnliche Chromatogramme wurde auch von LUYTEN und RUTTEN (46) berichtet. SHACKLETON et al. (59) haben mit Hilfe der GK-GC-Technik die Harnsteroide von Säuglingen im Alter von 1 bis 9 Monaten untersucht und dabei die zeitliche Abnahme der Exkretion von 3ß-Hydroxy-$\Delta^5$-Steroiden und 16$\alpha$-Hydroxy-Steroiden beobachtet, sowie die Befunde von HORNING bestätigt, wonach in den ersten Lebensmonaten die Ausscheidung von Cortisolmetaboliten zunimmt. Bei Neugeborenen mit 21-Hydroxylase-Defekt konnte SHACKLETON (60) zeigen, daß sich dieser Enzymdefekt im Harnsteroidprofil in der ersten Lebenswoche durch erhöhte Ausscheidung von 3ß-OH-5-en-Steroiden erkennen läßt und daß die erhöhte Ausscheidung von Pregnantriol und Pregnantriolon erst später erkennbar sein kann. TAYLOR und Mitarb. (65) zeigten am Beispiel eines Neugeborenen mit 21-OH-ase-Defekt vor und nach Cortison-Therapie die Nützlichkeit der GK-GC-Technik bei der Untersuchung von Steroidexkretion und -katabolismus. So konnten sie eine Reihe neuer Glucocorticoid-Metaboliten identifizieren, die vorwiegend in 1- und 6-Stellung hydroxyliert sind und deren biologische Bedeutung unklar ist. Die Identifikation von heterozygoten Merkmalsträgern des autosomal rezessiv vererbten AGS ist von zahlreichen Autoren sowohl durch gaschromatographische (GLEISPACH et al. (23), FIKENTSCHER (18)) als auch durch radioimmunologische Untersuchungen von 17$\alpha$-OH-Progesteron (u.a. WEIL et al. (72)) versucht worden. HOMOKI et al. haben die GK-GC-Technik angewandt und dabei zeigen können, daß nur bei

Eltern von homozygoten Merkmalsträgern das pathognomonische Steroid Pregnantriolon nach adrenaler Stimulation mit synthetischem ACTH (2 mg Cortrophin-Depot) möglich ist (32b).

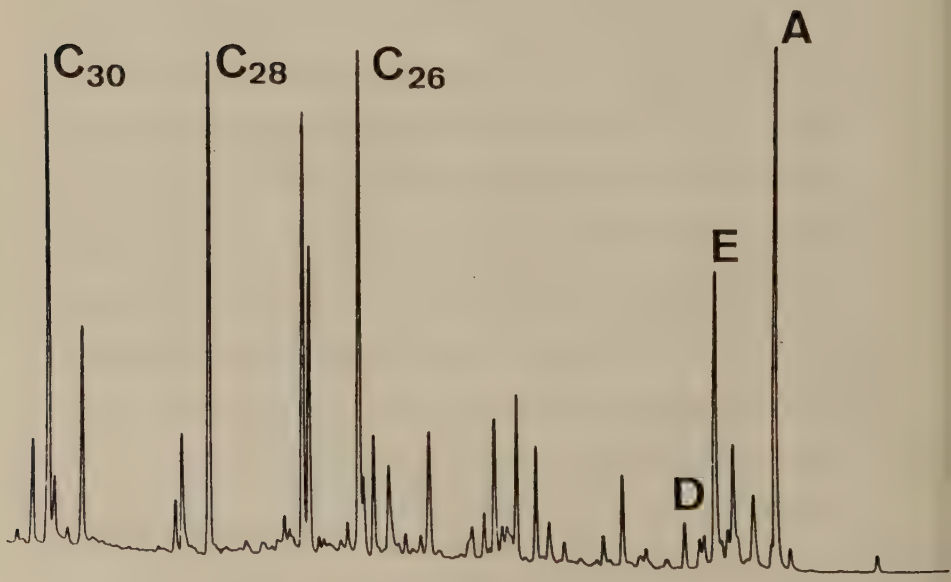
Die seltenere Variante des AGS, nämlich die des 11ß-Hydroxylase-Defekts wurde vor allem von ZACHMANN und Mitarb. (73) untersucht. Dabei wurde ein Fall eines 11ß-Hydroxylase-Defekts identifiziert, der auf 17 $\alpha$ -hydroxylierte Steroide isoliert ist, also zu einem hohen S/F-Quotienten führt, während das Verhältnis DOC : B normal blieb. Entsprechend waren auch die Verhältnisse der Tetrahydro-Derivate zueinander.

Die Steroidprofile nach exogener Inhibition der 11ß-Hydroxylase-Aktivität mit Metopiron wurde von KOEPP und Mitarb. (38) und ZACHMANN und Mitarb. mitgeteilt und mit den Chromatogrammen eines Patienten mit 11ß-Hydroxylase-Defekt verglichen. Dabei wurde die klinische Nützlichkeit von Tetrahydrodesoxycortisol (THS) bei der Diagnose des AGS mit 11ß-Hydroxylase-Defekt gezeigt. Dies wurde später auch von KNORR und BIDLING MAIER (40) bestätigt. Den seltenen Fall eines 18-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Defekts, der wegen des sich daraus ergebenden Hypoaldosteronismus zu Salzverlust führt, konnte von SHACKLETON und Mitarb. (61) mit Hilfe der GK-GC-MS-Technik nachweisen.

All den in dieser Übersicht referierten Anwendungsbeispielen ist gemeinsam, daß sich als ihr besonderer Vorteil die Möglichkeit der Entdeckung neuer Steroidmoleküle erwiesen hat.




Urinsteroidprofil einer gesunden Frau, 72-h-Urin, (10.-12. Tag des Cyclus)




Urinsteroidprofil eines 30-jährigen gesunden Mannes

A = Androsteron, E = Etiocholanolon, DHEA = Dehydroepiandrosteron, PD = Pregnandiol, PT = Pregnantriol, sowie die Alkane $C_{30}H_{64}$, $C_{28}H_{60}$ und $C_{26}H_{56}$.

## B.1. Bestimmung von 17α-Hydroxypregnanolon im Harn von Patienten mit 21-Hydroxylase-Mangel (HOLSBOER und KNORR (32))

Eingeschränkte oder fehlende Aktivität der 21-Hydroxylase ist biochemisch durch erhöhte Sekretionsraten von 17α-Hydroxyprogesteron charakterisiert. Diese Cortisolvorstufe wird über 17α-Hydroxypregnanolon zu Pregnantriol oder nach 11ß-Hydroxylierung zu Pregnantriolon katabolisiert (siehe Abb. B.1.1.).

Die Anwesenheit von 17α-Hydroxypregnanolon im Harn von Patienten mit AGS wurde zuerst von LIEBERMANN und DOBRINER (45) berichtet und später von FUKUSHIMA und GALLAGHER (19) bestätigt. Durch gaschromatographische Analyse von Harnsteroiden haben KECSKES und Mitarb. (37) im Harn von Patienten mit 21-Hydroxylase-Defekt 3α,17α-Dihydroxy-Methyl-D-Homoetiocholanolon nachweisen können, das aus 17α-Hydroxypregnanolon durch Acetylierung hervorgeht.

Inwieweit 17α-Hydroxypregnanolon bei 21-Hydroxylase-Mangel neben Pregnantriol und Pregnantriolon in vergleichbarer Menge ausgeschieden wird, wurde mit der beschriebenen GK-GC-Methode überprüft.

Die Harnproben wurden nach der Methode A.3.4. extrahiert und als MO-TMS-Äther unter Standardbedingungen analysiert. Die quantitative Analyse erfolgte nach der peak-Höhenmethode, wobei mitgeführtes 5α-Androstan 3ß-17ß-diol als interner Standard diente. Die Präzisionskriterien entsprachen

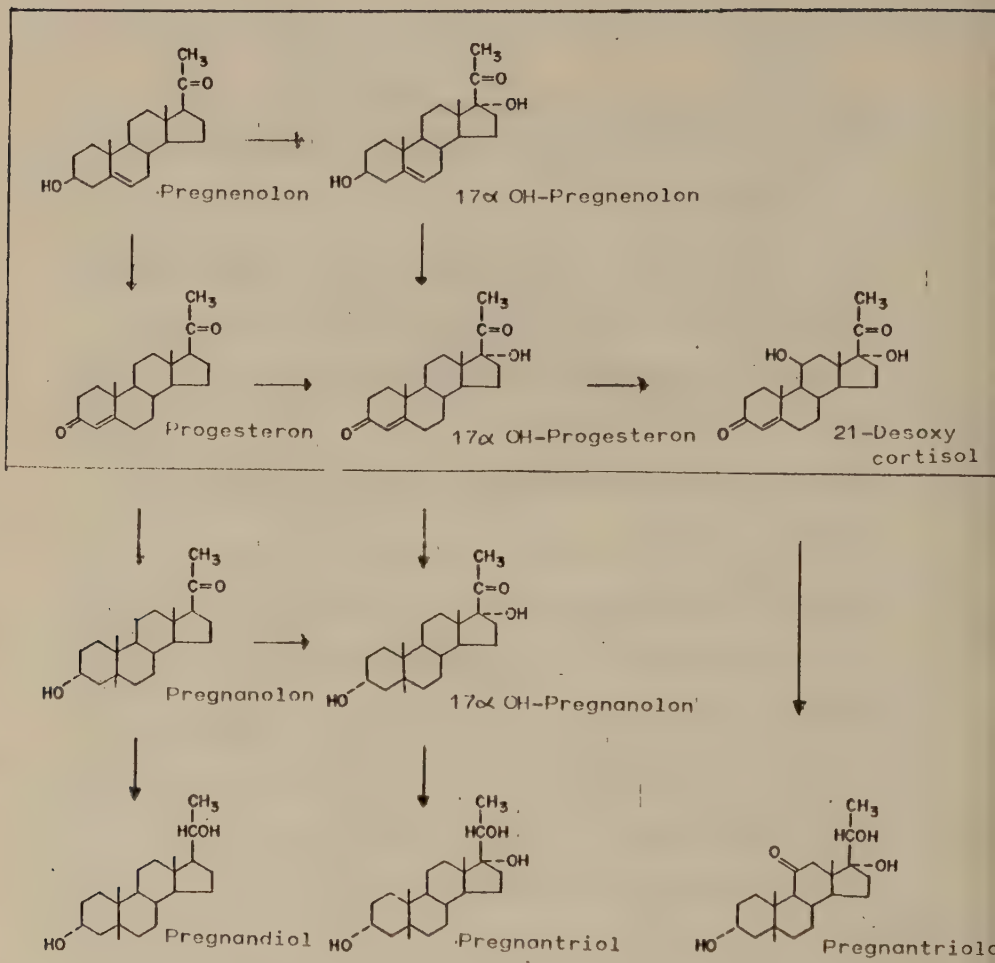


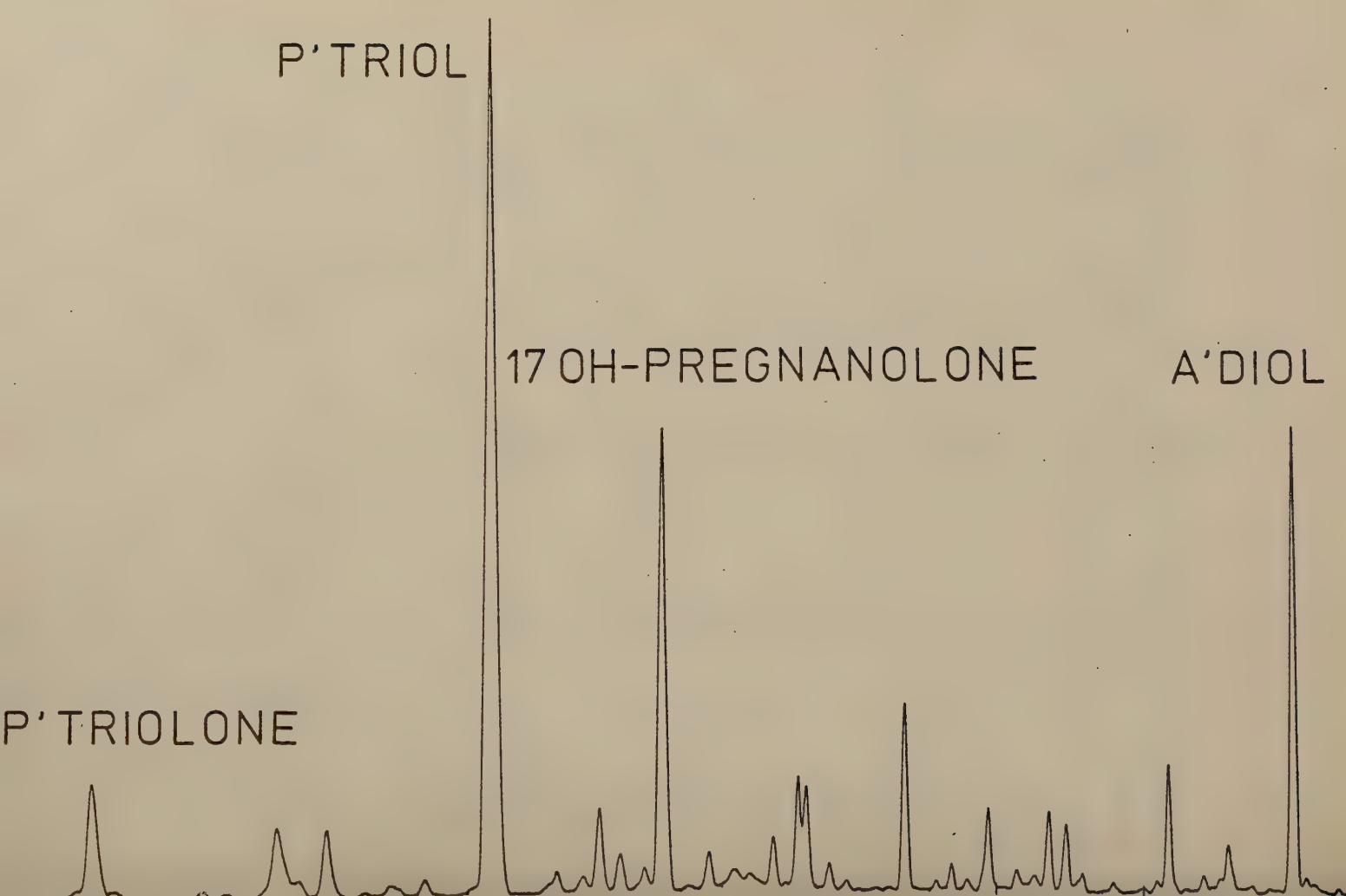

Abb. B.1.1.

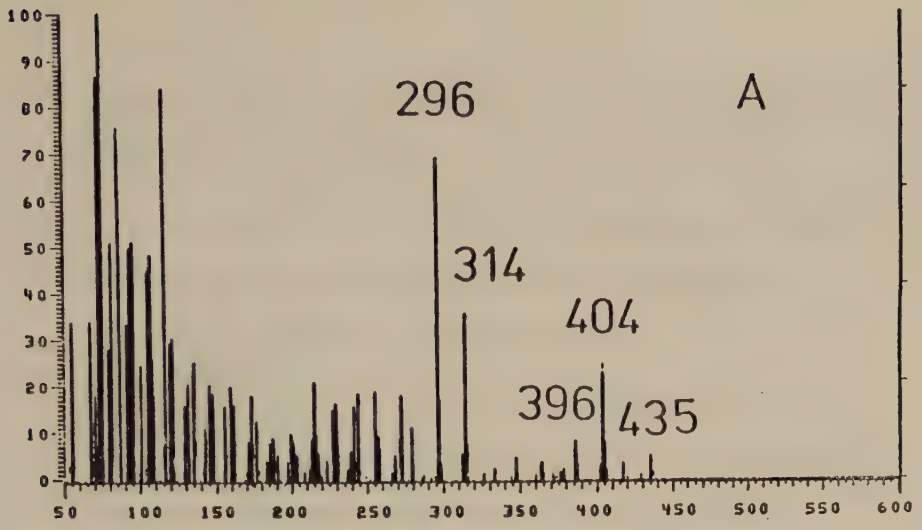
Synthese und Abbauprodukte wichtiger adrenaler Steroide

| Patient | Alter/ Geschlecht | 17-OH-pregnanolon mg/d | Pregnantriol mg/d | Pregnantriolon mg/d |
|---|---|---|---|---|
| A.S. | 7/w | 28.0 | 42.0 | 6.8 |
| H.O. | 8/w | 3.5 | 16.2 | 7.1 |
| H.C. | 9/w | 10.8 | 11.2 | 3.6 |
| Z.B. | 10/w | 31.2 | 24.0 | 6.4 |
| K.R. | 12/w | 18.0 | 25.0 | 3.7 |
| V.A. | 16/w | 28.0 | 56.0 | 6.4 |
| S.F. | 16/w | 6.4 | 10.2 | 0.6 |
| A.S. | 18/w | 16.0 | 22.0 | 5.8 |
| E.Z. | 18/w | 10.5 | 9.2 | 1.3 |
| K.S. | 18/w | 44.0 | 56.0 | 8.0 |
| K.M. | 19/w | 17.5 | 29.4 | 7.7 |
| I.R. | 20/w | 14.6 | 17.1 | 3.9 |
| R.H.-J. | 6/m | 15.2 | 19.1 | 6.5 |
| F.R. | 10/m | 5.4 | 5.7 | 2.6 |
| M.L. | 10/m | 5.3 | 10.5 | 3.0 |
| W.E. | 11/m | 4.8 | 7.5 | 1.5 |
| S.S. | 12/m | 6.8 | 14.5 | 4.7 |
| W.E. | 12/m | 15.0 | 14.6 | 4.6 |
| M.A. | 13/m | 26.8 | 36.0 | 16.4 |
| W.F. | 14/m | 4.0 | 3.0 | 2.6 |

Tab. B.1.1.

Ausscheidung von 17-OH-pregnanolon, Pregnantriol und Pregnantriolon bei 20 Patienten mit AGS bei 21-Hydroxylasemangel, der nicht oder nur unzureichend therapiert ist.


P'TRIOL
17 OH-PREGNANOLONE
A'DIOL
P'TRIOLONE



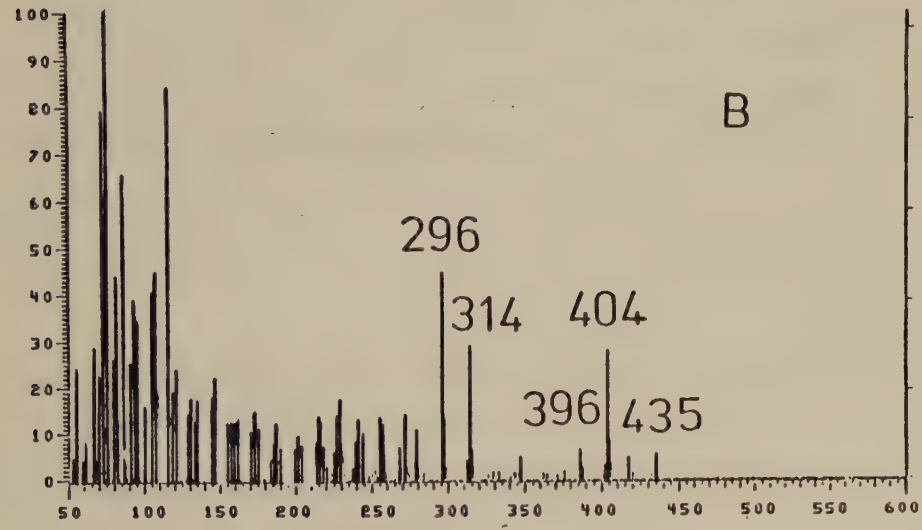




Abb. B.1.2.

Massenspektren (m/e, 70 eV) von 17$\alpha$-hydroxypregnanolon aus dem Urin eines an 21-Hydroxylasedefekt erkrankten Kindes (A) und einer authentischen Steroidprobe.

den in Teil I unter C.5. angegebenen. Die Identität von 17α-Hydroxypregnanolon wurde durch gekoppelte GC-MS-Analyse sichergestellt. Sowohl die Masse des Molekülions wie die der Fragmente waren in der Harnprobe bei den entsprechenden Methyleneinheiten identisch mit denen einer authentischen Vergleichsprobe (siehe Abb. B.1.2.).
Die von zwölf Patienten mit AGS infolge 21-Hydroxylase-Defekts ermittelten Harnkonzentrationen von Pregnantriol, Pregnantriolon und 17α-Hydroxypregnanolon zeigen, daß Pregnantriol und seine Vorstufe 17α-Hydroxypregnanolon in vergleichbarer Menge ausgeschieden werden (Tab. B.1.1.). Aus der Tatsache, daß zwischen Pregnantriol und 17α-Hydroxypregnanolon kein proportionaler Zusammenhang besteht, kann auf individuelle Schwankungen der 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase geschlossen werden. Ob 17α-Hydroxypregnanolon gegenüber Pregnantriol oder Pregnantriolon Vorteile bei der Therapieüberwachung oder Diagnostik von Patienten mit 21-Hydroxylasemangel hat, ist nicht geklärt.

## B.2. Harnsteroidprofil eines Patienten mit 21-Hydroxylase-Mangel und/oder 11ß-Hydroxylase-Defekt

Bei der Überprüfung der Anwendungsmöglichkeiten der GK-GC-Technik als diagnostisches Hilfsmittel fiel ein Befund wiederholt auf. Patienten mit AGS, ohne Hochdruck und mit allen biochemischen Hinweisen für 21-Hydroxylase-Mangel (17α-Hydroxyprogesteron-Erhöhung im Plasma und Pregnantriol und

Pregnantriolon im Harn erhöht) zeigten in geringem Ausmaß vereinzelt auch erhöhte Werte für Tetrahydrodesoxycortisol (THS) und in seltenen Fällen auch für Tetrahydrodesoxycorticosteron (THDOC) (siehe Abb. C.). Die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund ihrer MU-Werte. Die Identität von THS und THDOC wurde mit Hilfe der GC-MS-Technik abgesichert. Die Massenspektren der MO-TMS-Äther von THS und THDOC waren mit dem einer authentischen Probe von THS identisch. Das Auftreten von THS im Harn von Patienten mit hoher Konzentration adrenaler Androgene (siehe Tab. C.2.) könnte ein Zeichen eines kombinierten partiellen 21-/11ß-Hydroxylasedefekts sein. Es muß aber auch an die Möglichkeit einer sekundären Hemmung der 11ß-Hydroxylase durch adrenale Androgene, die infolge des primären congenitalen 21-Hydroxylase-Defekts im Übermaß gebildet werden, gedacht werden (SHARMA et al. (64)).

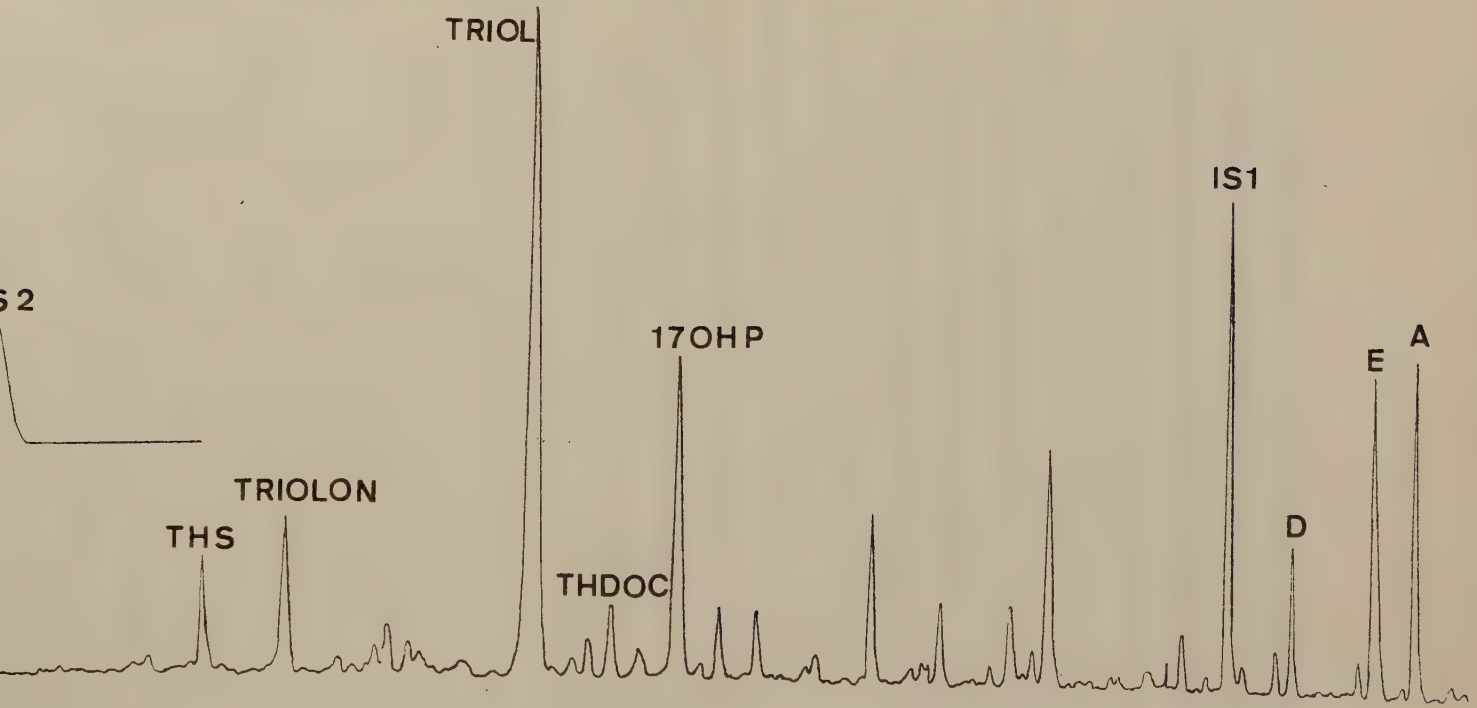



Abb. C.2.

| Steroid | mg/24h |
|---|---|
| Androsteron | 16,0 |
| Ätiocholanolon | 15,0 |
| Dehydroepiandrosteron | 7,0 |
| 17α-Hydroxypregnanolon | 20,0 |
| Pregnantriol | 30,0 |
| Pregnantriolon | 12,5 |
| Tetrahydrodesoxycortison | 10,0 |
| Tetrahydrodesoxycortisol | 6,0 |

Tab. C.2.

Harnsteroidkonzentrationen bei einem unbehandelten Patienten mit 21-Hydroxylase-Mangel und partiellem 11ß-Hydroxylasemangel

## C. Zusammenfassung

Die gaschromatographische Analyse von Harnsteroiden mit Dünnfilmglaskapillartrennsäulen (GK-GC) an stelle der bisher üblichen gepackten Säulen hat für die pädiatrische Endokrinologie wesentliche Vorteile. Aufgrund der guten Trennqualität ist es möglich, in einem einzigen Analysengang die Mehrzahl der relevanten Harnsteroide qualitativ und halbquantitativ zu bestimmen. Dabei werden "Steroidprofile" erhalten, die einer ganz bestimmten adrenalen oder gonadalen Fehlfunktion zugeordnet werden können. Weiterhin kann die Methode als Suchverfahren für solche Steroide verwendet werden, die mit radioimmunologischen Verfahren nicht erfaßt werden.

Beim Aufbau dieser Methode wurden zunächst die in der Literatur beschriebenen Aufarbeitungsmethoden miteinander experimentell verglichen und daraus eine hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeitskriterien und Praktikabilität geeignete Arbeitsvorschrift entwickelt. Dabei wurde die Möglichkeit der Steroidextraktion mittels Austauscherharz der reinen Lösungsmittelextraktion vorgezogen. Gestützt auf reaktionskinetische Untersuchungsergebnisse erwies sich die Derivatisierung der Steroide zu Methoxim-Trimethylsilyläthern gegenüber der Verwendung von Trimethylsilyl-Enoläthern als vorteilhaft.

Es wurde weiterhin der katalytische Einfluß von Trimethylchlorsilan (TMCS) und Kaliumacetat auf die Silylierungsreaktion untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, daß beide Substanzen die Geschwindigkeit der Silylierungsreaktion, aber nur TMCS auch das Reaktionsgleichgewicht im Sinne vermehrter Produktbildung zu beeinflussen vermag.

Eine Gegenüberstellung der Zuverlässigkeitskriterien hat gezeigt, daß bei der halbquantitativen Auswertung der Chromatogramme auf der Grundlage der Signalhöhen die Verwendung von zwei internen Standards günstig ist.
Die Anwendung des Verfahrens bei Patienten mit adrenogenitalem Syndrom (AGS) wegen 21-Hydroxylase-Mangel zeigte, daß neben Pregnantriol und Pregnantriolon auch 17α-Hydroxypregnanolon in vergleichbarer Menge ausgeschieden wird. Die Identität von 17α-Hydroxypregnanolon, dem unmittelbaren Abbauprodukt des 17α-Hydroxyprogesterons, wurde durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektroskopie abgesichert. Die Nützlichkeit von Harnsteroidprofilen wurde am Beispiel eines Patienten mit 21-Hydroxylasemangel aufgezeigt, bei dem neben den für diesen Stoffwechseldefekt charakteristischen Metaboliten auch diejenigen erhöht waren, die für einen 11ß-Hydroxylase-Mangel pathognomonisch sind.

Sowohl die aus der Literatur referierten, wie auch die eigenen Ergebnisse zeigen, daß die mit Hilfe der GK-GC-Methode zugänglichen "Steroidprofile" für die Diagnose von Steroidsynthesestörungen wie auch für die Therapieüberwachung von Nutzen sind. Fortschritte im

Hinblick auf Präzisionskriterien sind weniger von Verbesserungen bei der Extraktion oder Derivatisierung, sondern bei der Probeneingabe in den Gaschromatographen und von der automatisierten Auswertung der Signale zu erwarten.

Literaturverzeichnis

1. AXELSON, M., SJÖVALL, J.:
Selective liquid chromatographic isolation procedure for gas chromatographic-mass-spectrometric analysis. J. of Chromatogr. 126, 705-716(1976)

2. BAILEY, E., FENOUGHTY, M., CHAPMAN, J.R.:
Evaluation of a gas-liquid chromatographic method for the determination of urinary steroids using high-resolution open-tubular glass capillary columns. J. of Chromatogr. 96, 33-46 (1974)

3. BONGIOVANNI, A.M.:
Detection of pregnandiol and pregnantriol in urine of patients with adrenal hyperplasia. Bull. Johns Hopkins Hosp. 92, 244-251 (1953)

4. BRADLOW, H.L.:
Extraction of steroid conjugates with a neutral resin. Steroids 11, 265-272 (1968)

5. BRADLOW, H.L.:
Modified technique for the elution of polar steroid conjugates from Amberlite XAD-2. Steroids 30, 2177, (1977)

6. BUTLER, G.C., MARRIAN, G.F.:
Isolation of pregnane-3,17,20 triol from urine of women showing androgenital syndrome. J. Biol. Chem. 119, 565-578 (1937)

7. CHAMBAZ, E.M., MAUME, G., MAUME, B., HORNING, E.C.:
Silylation of steroids, formation of enol-trimethylsilyl-ethers and oxysilylation products. Analytical letters 12, 749-761 (1968)

8. CHAMBAZ, E.M., HORNING, E.C.:
Conversion of steroids to trimethylsilyl derivatives for gas phase analytical studies: reactions of silylating reagents. Anal. Biochem. 30, 7-24 (1969)

9. CHAMBAZ, E.M., DEFAYE, G., MADANI, C.:
Trimethylsilyl ether-enol-trimethylsilyl ether - a new type of derivative for the gas phase study of hormonal steroids. Anal. Chemistry 45, 1090 (1973)

10. COREY, E.J., VENKATESWARLU, A.:
Protection of hydroxyl groups as test. butyldimethylsilyl derivatives. J.Amer.Chem.Soc. 94, 6190-6191 (1972)

11. CURTIUS, W-Ch., MÜLLER, M.:
Gas-liquid chromatography of ketosteroids and progesterone metabolites of urine: comparison of different methods of hydrolysis. J.Chromatogr. 30, 410-427 (1967)

12. CURTIUS, H.C., VÖLLMIN, J., ZAGALAK, M.J., ZACHMANN, M.:
Gas chromatography of steroids and its clinical applications including loading tests with deuterated compounds. J. Steroid Biochem. 6, 677-684 (1975)

13. EGGER, H.J., REINER, J., SPITELLER, G.:
Harn-Steroidprofile hirsuter Frauen. J. of Chromatogr. 145, 359-369 (1978)

14. EGGSTEIN, M., LIEBICH, H.M.:
Mass spectrometry and combined technique in medicine, clinical chemistry and clinical biochemistry. Symposium 14-15 Nov. 1977, Tübingen

15. EIK-NES, K.B., HORNING, E.C.:
Gas phase chromatography of steroids. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1968

16. FANTL, V., GRAY, C.H.:
Automated urinary steroid profiles by capillary column gas-liquid chromatography and a computing integrator. Clin. Chim. Acta 79, 237-253 (1977)

17. FINKELSTEIN, M.:
Pregnantriolone, an adrenal urinary steroid. In: Methods in hormone research. (Ed: R. J. Dorfman) Academic Press, New York, London 1962

18. FIKENTSCHER, E.M.:
Über die Ausscheidung von Pregnantriol und Pregnantriolon im Harn unter ACTH-Stimulation beim kongenitalen adrenogenitalen Syndrom (AGS); Versuch eines Heterozygoten-Tests. Inaugural-Dissertation, LMU - München 1974

19. FUKUSHIMA, D.K., GALLAGHER, T.F.:
Steroid isolation studies in congenital adrenal hyperplasia. J.Biol.Chem. 229, 85-92 (1957)

20. GARDINER, W.L., HORNING, E.C.:
Gas-liquid chromatographic separation of $C_{19}$ and $C_{21}$ human urinary steroids by a new preocedure. Biochim. Biophys. Acta 115, 524-526 (1966)

21. GASKELL, S.J., BROOKS, C.J.W.:
t-butyldimethylsilyl derivatives in the gas chromatography - mass spectrometry of steroids

22. GERMAN, A.L., PFAFFENBERGER, C.D., THENOT, J.-P., HORNING, M.G., HORNING, E.C.:
High resolution gas chromatography with thermostable glass open tubular capillary columns. Analytical Chemistry 45, 930 (1973)

23. GLEISPACH, H., BERGER, H., GLATZL, J., RÖSSLER, H., TSCHAGER, E.:
Pregnantriolon-Ausscheidung nach ACTH-Stimulierung bei mutmaßlich heterozygoten Merkmalsträgern eines 21-Hydroxylase-Defekts. Pädiatrie und Pädologie 6, 287-296 (1971)

24. GLEISPACH, H.:
The use of different silylating agents for structure analyses of steroids. Journal of Chromatography 91, 407-412 (1974)

25. GRAEF, V., FUCHS, M.:
Untersuchungen zur vollständigen enzymatischen Hydrolyse von Steroidkonjugaten im Harn. Z. Klin.Chem. Klin.Biochem. 13, 163-167 (1975)

26. GROB, K., GROB, G.:
Splitless injection on capillary columns I The basic technique; steroid analysis as an example.
J. Chromatogr. Sci. 7,584-586 (1969)

27. GROB, K., GROB, G.:
Methodik der Kapillar-Gas-Chromatographie - Hinweise zur vollen Ausnutzung hochwertiger Säulen. 1. Teil: Die Direkteinspritzung. Chromatographia 5, 1-20 (1972)

28. GROB, K., GROB, K. jr.:
On-column injection onto glass-capillary columns.
J.Chromatogr. 151, 311-320 (1978)

29. GROB, K. jr., NEUKOM, H.P.:
Factors affecting the accuracy and precision of cold on-column injections in capillary gas chromatography. J. of Chromatography 189, 109-117 (1980)

30. GUSTAFSSON, J.A., ERIKSSON, H.:
Excretion of steroid hormones in adults. Steroids in urine from adults. Clin.Chim.Acta 41, 79-90 (1972)

31. HORNING, E.C., HORNING, M.G., STAFRANEK, J., VAN HOUT, P., GERMAN, A.L., THENOT, J.P., PFAFFENBERGER, C.D.:
Gas phase analytical methods for the study of human metabolites. Metabolic profiles obtained by open tubular capillary chromatography. J.Chromatogr. 91, 367-378 (1974)

32a. HOLSBOER, F., KNORR, D.:
Determination of urinary 17-hydroxypregnanolone by gaschromatography-mass spectrometry in patients with congenital adrenal hyperplasia. J.Steroid.Biochem. 8, 1197-1199 (1977)

32b. HOMOKI, J., TELLER, W.M., FAZEKAS, A.T.A.:
A test for heterozygosity of 21-hydroxylase deficiency. Hum.Gen. 32, 35-41 (1976)

33. JÄNNE, O., VIKKO, R.:
Neutral steroids in urine during pregnancy (I)
Acta Endocrinologica 65, 50-68 (1970)

34. JAILER, J.W.:
Virilism. Bull. N.Y. Acad. Med. 29, 377 (1953)

35. JARDINE, F.H., OSBORN, J.A. und WILKINSON, G.:
Further studies on the homogeneous hydrogenation of olefins using tris(triphenylphosphine)halogeno-rhodium (I). J.Chem.Soc. (A) 1574-1578 (1967)

36. de JONG, A.P.J.M., ELEMA, J., van den BERG, B.J.T.:
Gas chromatography mass spectrometry of t-butyl-dimethylsilyl derivatives of organic acids.
Biomed.Mass.Spectrom. 7, 359-364 (1980)

37. KOEPP, P., VÖLLMIN, J.A., ZACHMANN, M., CURTIUS, H.-Ch.:
Determination of urinary tetrahydro-11-deoxycortisol and tetrahydro-11-deoxycorticosterone by gaschromatography. Acta Endocr. 66, 756-768 (1971)

38. KECSKÉS, L., TÉNYI, L., NÉMETH, M., JURICSKAY, Z., TEMESI, M.:
Significance of 3$\alpha$,17$\alpha$-dihydroxy-5ß-pregnane-20-one in the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia.
Endokrinologie 66, 94-99 (1975)

39. KNORR, D.:
Ultrareine Glasgeräte durch Ausheizen auf 500°.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 9, 175-176 (1971)

40. KNORR, D. und BIDLINGMAIER, F.:
Diagnosis of congenital adrenal hyperplasia with 11-hydroxylase deficiency by determination of tetrahydro-11-desoxycortisol. Helv.paediat.Acta Suppl. 34, 119-125 (1974)

41. KNORR, D.:
Störung der sexuellen Differenzierung.
Internist 20, 85-94 (1979)

42. LEE, P.A., PLOTNICK, L.P., KOWARSKI, A.A., MIGEON,C.J.:
Congenital adrenal hyperplasia. University Park Press, Baltimore, Tokyo, London (1977)

43. LEON, Y.A., BULBROOK, R.D., CORNER, E.O.S.:
Steroid sulfatase, arylsulfatase and ß-glucuronidase in the mollusca. J.Biochem. 75, 612-617 (1960)

44. LEUNISSEN, W.J.J., THISSEN, J.H.H.:
Quantitative analysis of steroid profiles from urine by capillary gas chromatography. J.of Chromatogr. 146, 365-380 (1978)

45. LIEBERMANN, S., DOBRINER, K.:
Isolation of pregnandiol-3α ,17one-20 from urine. J.Biol.Chem. 161, 269-278 (1945)

46. LUYTEN, J.A., RUTTEN, G.A.F.M.:
Analysis of steroids by high-resolution gas-liquid chromatography. J. of Chromatogr. 91, 393-406 (1974)

47. LUDWIG-KÖHN, H., MESSING, F., SPITELLER, G.:
Profile bei chronischen Erkrankungen: II. Steroid-profile von Patienten mit Psoriasis vulgaris.
J. of Chromatography 162, 573-578 (1979)

48. MATSUI, M., HAKOZAKI, M., KINUYAMA, Y.:
Extraction of steroid diconjugates using Amberlite XAD-2 resin. J. of Chromatogr. 115, 625-628 (1975)

49. MASON, H.L., KEPLER, E.J.:
Isolation of steroids from urine of patients with adrenal cortical tumors and adrenal cortical hyperplasia: New 17-Ketosteroid-, androstan3(α),11diol-17one.
J.Biol.Chem. 161, 235 (1945)

50. OSBORN J.A., JARDINE, F.H., YOUNG, J.F. und WILKONSON, G.:
The preparation and properties of tris(triphenylphosphine) halogenorhodium(I) and some reactions thereof including catalytic homogeneous hydrogenation of oefins and acetylenes and their derivatives.
J.Chem.Soc. (A), 1711-1732 (1966)

51. PFAFFENBERGER, C.D., MALINAK, L.R., HORNING, E.C.:
High-resolution biomedical gas chromatography.
J. of Chromatogr. 158, 313-330 (1978)

52. PHILLIPOU,G., BIGHAM, D.A., SEAMARK, R.F.:
Steroid t-butyldimethylsilyl ethers as derivatives for mass fragmentography. Steroids 26, 516-524 (1975)

53. POY, F., GAGLIARDI, P., BISI, D.:
Fully automatic gaschromatographic analysis of steroids using solid samples in packed and capillary columns.
Firmenschrift Carlo Erben (1976)

54. ROS, A.:
Method for dry-sampling in gas chromatography.
J. Gas Chromatogr. 3, 252 (1965)

55. ROS, A., SOMMERVILLE, I.F.:
Gas-liquid chromatography with high resolution glass capillary columns for the determination of urinary steroids. The J. of Obst. and Gynaecology of the Br. Commonwealth 78, 1096-107 (1971)

56. SCHOMBURG, G., DIELMANN, W.:
Identification by means of retention parameters.
J. Chromatogr. Sci. 11, 151-159 (1973)

57. SETCHELL, K.D.R., ALME, M., AXELSON, M., SJÖVALL, J.:
The multicomponent analysis of conjugates of neutral steroids in urine by lipophilic ion exchange chromatography and computerized gas chromatography-mass spectrometry. J. Steroid Biochem. 7, 615 (1976)

58. SHACKLETON, C.H.L., SJÖVALL, J., Wisen, O.:
A simple method for the extraction of steroids from urine. Clin.Chim.Acta 27, 354-356 (1970)

59. SHACKLETON, C.H.L., GUSTAFSSON, J.A., MITCHELL, F.L.:
Steroids in newborn and infants. Acta Endocrinologia 74, 157-167 (1973)

60. SHACKLETON, C.H.L.:
The excretion of steroids by the adult marmoset monkey (callitrix jacchus). J.Steroid Biochem. 6, 1429-1432 (1975)

61. SHACKLETON, C.H.L., HONOUR, J.W., DILLON, M., MILLA,P.:
Component gas chromatographic analysis of urinary steroids excreted by an infant with a defect in aldosterone biosynthesis. Acta Endocrinol. 81, 762-773 (1976)

62. SHACKLETON, C.H.L.:
Congenital adrenal hyperplasia caused by defect in steroid 21-hydroxylase. Establishment of definitive urinary steroid excretion pattern during first weeks of life. Clin.Chim.Acta 67, 287-298 (1976)

63. SHACKLETON, C.H.L., HONOUR, J.W., DILLON, M., MILLA,P.:
A multi component gas chromatographic analysis of urinary steroids excreted by an infant with a defect in aldosterone biosynthesis. Acta Endocrinol. 81, 762-773 (1976)

64. SHARMA, D.C., FORCHIELLI, E.; DORFMAN:
Inhibition of enzymatic steroid 11ß-hydroxylation by androgens. J.Biol.Chem. 283, 572-575 (1963)

65. TAYLOR, N.F., CURNOW, D.H., SHACKLETON, C.H.L.:
Analysis of glucocorticoid metabolites in the neonatal period: metabolism of cortisone acetate by an infant witz 21-hydroxylase deficiency. Clin.Chim. Acta 85, 219-229 (1978)

66. TAYLOR, N.F., SHACKLETON, C.H.L.:
Gas chromatographic steroid analysis for diagnosis of placental sulfatase deficiency: A study of nine patients. J.Clin.End.Metab. 49, 78 (1979)

67. THENOT, J.P., HORNING, E.C.:
GC behavior of 3-ketosteroid methoximes, application to GC studies of adrenocortical steroid hormone MO-TMS derivatives. Analytical Letters 5(11), 801-814 (1972)

68. THENOT, J.P., HORNING, E.C.:
GC-MS derivatization studies: the formation of dexamethasone MO-TMS. Analytical Letters 5(12), 905-913 (1972)

69. VIINIKKA, L., JÄNNE, O.:
Urinary excretion of neutral steroid glucuronides with reference to the menstrual cycle. Clin.Chim.Acta 49, 277-285 (1973)

70. VÖLLMIN, J.A.:
Gas-chromatographic separation of steroids on glass capillary columns. Chromatographia 3, 233 (1970)

71. VÖLLMIN, J.A.:
Separation and identification of urinary steroids on glass capillary columns in a combination of gas chromatograph and mass spectrometer. Chromatographia 3, 238 (1970)

72. WEIL, J., BIDLINGMAIER, F., SIPPELL, W.G., BUTENANDT, O., KNORR, D.:
Comparison of two tests for heterozygosity in congenital adrenal hyperplasia (CAH). Acta Endocrinol. 91, 109-121 (1979)

73. ZACHMANN, M., VÖLLMIN, J.A., NEW, M.I., CURTIUS, H.-Ch., PRADER, A.:
Congenital adrenal hyperplasia due to deficiency of 11β-hydroxylation of 17α-hydroxylated steroids. J.Clin.Endocr. 33, 501-508 (1971)

Herrn Prof. Dr. K. Betke danke ich, daß er mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit an der Universitätskinderklinik ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. D. Knorr danke ich für die Überlassung des Themas, für viele Ratschläge und wohlwollende Unterstützung bei der Einarbeitung in das Sachgebiet.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dipl.-Biochem. F. Bidlingmaier für viele wertvolle Anregungen bei speziellen Fragestellungen.

## LEBENSLAUF

Am 27. Mai 1945 wurde ich, Florian Holsboer, als Sohn des Schauspielers Willem Holsboer und seiner Ehefrau Margot geb. Rupp in München geboren.

| | |
|---|---|
| 1951 | Besuch der Gebele-Volksschule in München |
| 1965 | Abschluß der Schulausbildung mit dem Reifezeugnis, erhalten von der Luitpold-Oberrealschule in München |
| 1965-1971 | Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Wadham-College in Oxford |
| 1971 | Diplomchemiker-Hauptprüfung und Anfertigung der Diplomarbeit in theoretischer anorganischer Chemie; seither als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für anorganische Chemie tätig |
| 1973 | Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1974 | Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften in analytischer Chemie am Institut für anorganische Chemie (Prof. Dr. W. Beck) der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1976-1977 | Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung für pädiatrische Endokrinologie (Vorstand: Prof. Dr. D. Knorr) an der Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. K. Betke) |
| 1979 | Staatsexamen in Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München; seither Weiterbildung zum Arzt für Psychiatrie an der psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. H. Hippius) |